التحضيرات النباتية والفحص المجهرى

(الميكروتكنيك)

د. محمد عبد العزيز نصار
د. قاسم فؤاد السحار



المكتبة الأكاديمية



التحاليل الطبيعية والكيماوية

للزيوت والدهون

التحضيرات النباتية والفحص المجهرى

(الميكروتكنيك)

دكتور

محمد عبد العزيز نصار

أستاذ بقسم النبات الزراعى
كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور

قاسم فؤاد السحار

أستاذ بقسم النبات الزراعى
كلية الزراعة - جامعة القاهرة



الناشر

المكتبة الاكاديمية

١٩٩٨

حقوق النشر

المكتبة الأكاديمية
١٢١ ش التحرير ـ الدقى ـ القاهرة
تليفون : ٣٤٨٥٢٨٢/ ٣٤٩١٨٩٠
فاكس : ٣٤٩١٨٩٠ـ٢٠٢

مقدمة

بسم الله الرحمن الرحيم ، والحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أفضل الخلق أجمعين محمد الرسول الأمين ، خاتم الأنبياء ، وسيد المرسلين ، وعلى آله وصحبه والتابعين .

مع اكتشاف زخارياس جانسن Zacharias Jansen للمجهر الضوئى فى عام ١٥٩٠ بدأ الإنسان رحلته فى دراسة التركيب الدقيق للكائنات الحية ليعرف ما تضم من أنسجة مختلفة ، ولاشك أن أى تقدم فى فهم التركيب الداخلى للكائنات الحية يقوم على ركيزتين أساسيتين ، تتمثل الركيزة الأولى فى كيفية إعداد العينة المطلوب دراستها للفحص المجهرى ، والركيزة الثانية هى التقدم فى صناعة البصريات وبالتالى المجهر المستخدم فى الفحص .

تفتقر المكتبة العربية إلى مؤلفات تتناول أى من هاتين الركيزتين ويهدف هذا الكتاب إلى تقديم جهد متواضع فى هذا الشأن لينتفع به كل دارس للنباتات يحاول إماطة اللثام عن التركيب التشريحى لها سواء كان باحثا فى مجال علم تشريح الأنسجة Histology أم علم الوراثة Genetics أم علم أمراض النبات Plant pathology أم علم الخلية Cytology أم علم الأجنه Embryology أم علم حبوب اللقاح Palynology .

يتناول هذا الكتاب بالشرح المبادىء العامة لكيفية تجهيز معمل للميكروتكنيك النباتى وما يتطلبه من أدوات وأجهزة وكيماويات مختلفة كذلك الاحتياطات الواجبة وأسلوب العناية اللازمة للحصول على نتائج دقيقة - كما يتناول الكتاب أيضًا كيفية تحضير العينة منذ أخذها من النبات حتى تحضير الشريحة للفحص المجهرى وتحليل النتائج - ولم يغفل الكتاب أيضًا تقديم شرح مبسط لكل من المجهر الضوئى والمجهر الإلكترونى بنوعيه المتخلل والمساح حتى

يكون العرض شاملاً لمختلف الجوانب التى يتطلبها من ينشد دراسة التركيب الدقيق للنباتات.

نسأل الله العلى القدير أن يكون لهذا الجهد المتواضع فائدته المنشودة للمهتمين بعمل التحضيرات النباتية الدقيقة للفحص المجهرى ، وأن يكون حافزا لمزيد من الدراسة النباتية التى تضيف الجديد للعلم فى وطننا العربى .

المؤلفان

المحتويـــات

الموضـــوع	الصفحة

الموضـــوع	الصفحة

الموضــــوع	الصفحة

الموضـــوع	الصفحة

الموضـــوع	الصفحة

الموضــوع	الصفحة



تمهيد

تشكل الدراسة العملية للعلوم البيولوجية عامة وعلم النبات خاصة القاعدة الأساسية لهذه العلوم لما توفره للدارس من خبرات مباشرة ، وصورة شاملة واعية للعينة موضع الفحص يرتبط فيها الجزء بالكل ويتضح من خلالها التناسق والتنسيق بين هذه الأجزاء لتكون كلاً متكاملاً ، وهو ما لايمكن - أو قد يصعب - تخيله ذهنيا بدون الفحص العملى الدقيق ، ومن هنا كانت أهمية الدراسة العملية .

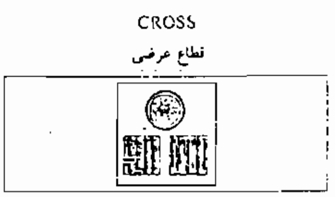
ومن الدراسات العملية التى على درجة عظيمة من الأهمية دراسة الميكروتكنيك النباتى ، ويقصد بها تحضير الشرائح سواء كانت مؤقتة أم مستديمة والتى تهيىء للباحث القدرة على فحص التركيب الداخلى للأعضاء النباتية المختلفة مما يتيح له فرصة تعرف تركيب النبات ، وما قد يكون لذلك من أهمية فى تفسير عديد من الظواهر العلمية المختلفة . وقد ساهمت هذه الدراسة فى تطور وتقدم الكثير من العلوم النباتية مثل : علم التشريح Anatomy - وعلم الخلية Cytology - وعلم الأنسجة Histology - وعلم حبوب اللقاح Palynology - وعلم الأجنة Embryology - وعلم التقسيم Taxonomy - وعلم الأمراض Pathology - وعلم الوراثة Genetics - وعلم الفسيولوجى Physiology - وعلم التربية Breeding - وعلم زراعة الأنسجة Tissue - culture .

تعتبر دراسة الميكروتكنيك النباتى أمرا يسيرا من الوجهة النظرية وإن كانت من الوجهة العملية تحتاج إلى صبر وممارسة طويلة حتى يمكن للمرء إتقانها واكتساب الخبرة التى تمكنه من الحصول على أفضل النتائج المرجوة عند تحضير الشرائح . ويعقب تحضير الشرائح قراءتها ثم رسمها أو تصويرها ، إذ إن تحضير الشرائح لايعتبر هدفًا فى حد ذاته ، وتتوقف طريقة تحضير الشرائح على الهدف الذى من أجله تجرى عملية التحضير والمجال العلمى الذى سوف تستخدم فيه هذه الشرائح . فقد يكون التحضير لمجرد دراسة أولية تلقى الضوء على مايليها من تحضيرات لشرائح مستديمة ، حيث يقوم الباحث أولاً بعمل تحضيرات مؤقتة ثم من قراءتها يحدد الأجزاء التى يرى أن لها أهمية فى دراسته .

قد يتطلب الأمر تحضير شرائح مستديمة لقطاعات مسلسلة Serial sections كما هو الحال عند دراسة القمم النامية وعند دراسة سلوك الحزم الوعائية سواء فى الأعضاء الخضرية أو الزهرية . ويجب عند دراسة القمم النامية أو البراعم عدم تغيير السمك الذى يتم القطع عليه مع المحافظة على نظام تسلسل القطاعات على كل شريحة وكذلك ترتيب الشرائح المتعاقبة حتى يتسنى تحديد البعد الذى يبدأ عنده تكشف كل ورقة والبراعم الموجودة فى آباط الأوراق وعددها وكذلك البعد الذى يتم عنده تكشف نسيج الخشب ونسيج اللحاء وبداية تكشف الفجوات فى الخلايا إلى غير ذلك من الدراسات التشريحية . ويتم تحديد هذه الأبعاد من خلال تقدير سمك وعدد القطاعات ، لذلك يلزم عدم إهمال أى من القطاعات ونظام تسلسلها أو تغيير سمك القطع .

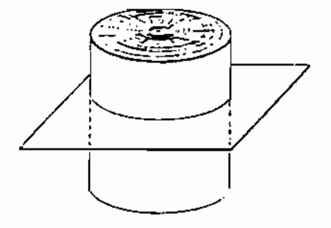
يتطلب الأمر عند تحضير شرائح للدراسات المرضية أن يكون القطع فى موضع الإصابة وإلى أعلاها وأسفلها ، ولايلزم فى هذه الحالة تحضير قطاعات مسلسلة ، ويجب أن تبدأ الدراسة من بداية العدوى الصناعية وعلى مراحل حتى المرحلة الأخيرة من تقدم المرض .

تجهز القطاعات بالقطع فى اتجاهات مختلفة (شكل ١) فقد تكون عرضيا Transverse أو طوليا Longitudinal أو مماسيا Tangential أو مائلا Oblique أو قطريا Radial وقد يحتاج الأمر إلى عمل سلخ فى البشرة Epidermal peel أو كشط Scrape . وعند دراسة أشكال الخلايا ودراسة النقر تجرى عملية تفكيك Maceration للأنسجة لتحديد الشكل المنظور المجسم للخلايا ، أما عند دراسة مسار الحزم الوعائية فى الأجزاء الرقيقة كالأوراق والسبلات والبتلات والسوق الجوفاء فيمكن إزالة الكلوروفيل بمعاملة هذه الأجزاء النباتية كيميائيا لترويقها أى لجعلها شفافة Clearing ثم بعد ذلك تجرى الدراسة المطلوبة . ويجرى عد الكروموسومات فى الدراسة الوراثية والسيتولوجية بعمل دهك Smearing للأنسجة خاصة المرستيمية (القمم النامية) وكذلك المتوك وتستخدم صبغة الاسيتوكارمين حتى يتسنى تحديد عدد الكروموسومات .



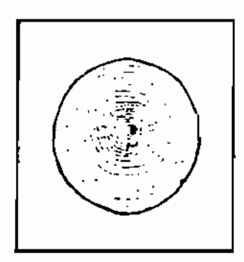
RADIAL TANGENTIAL

قطاع قطرى قطاع مماسى



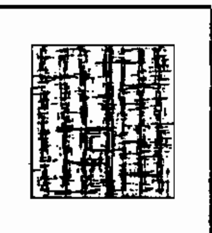
CROSS

قطاع عرضى



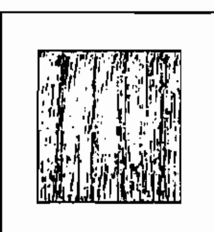
RADIAL

قطاع قطرى



TANGENTIAL

قطاع مماسى



Placement of twig sections

شكل (١) : الاتجاهات المختلفة لتقطيع عينة من ساق النبات .

(ويلى Willey ١٩٧١)

١ . المبادىء العامة

الأدوات والأجهزة الواجب توافرها فى المعمل

أولاً : أدوات التشريح (شكل ١ - ١)

(١) مجموعة ملاقط متكاملة Different types of forceps

توجد أنواع كثيرة من الملاقط منها ما هو مدبب الطرف مسحوب ، ومنها ما هو مفلطح الطرف ، ومنها ما يكون طرفه مستديرًا وليس مستدقا ولكل منها استعمالاته الخاصة به ، وكلها تستعمل فى حمل وتناول الأجزاء النباتية المختلفة أو الإمساك بالأدوات الرفيعة .

(٢) مقص أو أكثر Scissors

ويستعمل فى معامل النبات عادة ذلك النوع ذو الطرف المدبب الرفيع .

(٣) إبر تشريح Needles

وهى إما مستقيمة أو منحنية وتستعمل فى فرد وتفتيح الأجزاء النباتية لإبراز تراكيبها الداخلية ، كما تستخدم فى تنظيم العينات النباتية (المطمورة فى شمع البارافين) أثناء عملية الصب فى القوالب فى صفوف فى الوضع الملائم للقطع .

(٤) مشرط Scalpel

ويستخدم فى تجزئة العينات النباتية .

(٥) موسى التشريح Dissecting razor

ويستخدم فى عمل القطاعات اليدوية خلال العينات النباتية الحية أو المحفوظة ، ويمكن للشخص المتمرن الماهر الحصول على قطاعات رقيقة لدراسة التركيب الداخلى للعينة تحت الدراسة .

(٦) فرشاة Brush

وتستعمل فرشاة ذات شعر ناعم لحمل القطاعات والأجزاء النباتية الرقيقة بلطف حتى لاتتهتك الأنسجة أثناء التعامل معها .

ثانيا : الادوات الزجاجية

(١) مجموعة من الزجاجات Reagent bottles

ذات سعات مختلفة (٢٥٠ - ٥٠٠ مل) وتستعمل فى تحضير المحاليل ذات التركيزات المختلفة ، وتفضل الزجاجات ذات الغطاء الزجاجى المصنفر .

(٢) مجموعة من الأقماع Funnels مختلفة القطر (شكل ١ - ٢)

(٣) قضيب زجاجى لتقليب المحاليل .

(٤) مجموعة من المخابير Cylinders

توفر مجموعة من المخابير المدرجة مختلفة السعة (٢٥ - ١٠٠ - ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ مل) .

(٥) ماصة مدرجة أو أكثر Pipette

وتستخدم فى نقل المحاليل عند تحضيرها .

(٦) مجموعة من الكاسات Beakers مختلفة السعة (٢٥ - ١٠٠ - ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ مل) .

(٧) أنابيب ذات غطاء محكم من الفلين Corked vials لحفظ العينات النباتية خلال المراحل المتتالية لإعدادها - وكذلك الحوامل الخاصة بها .

(٨) مجموعة من زجاجات الساعة Watch glass مختلفة السعة .

وهى آنية زجاجية مقعرة توضع فيها العينات النباتية أو القطاعات (التى تجرى باليد باستخدام موسى التشريح أو بواسطة الميكروتوم المنزلق أو الثلجى حيث لايتكون شريط فى كلتا الحالتين) لإجراء عملية الصبغ .

(٩) شرائح زجاجية Slides وأغطية للشرائح Covers تستعمل الشرائح فى تحميل القطاعات تمهيدًا لفحصها مجهريا ، ويستحسن من الشرائح ذات الحافات المستديرة ، أما الأغطية فيفضل أن تكون بالشكل المناسب (مربعة - مستطيلة - مستديرة) لنوع الدراسة .

(١٠) زجاجات التقطير Dropping bottle with pipette

زجاجات ذات غطاء خاص مزود بقطارة تستخدم لحفظ محلول اللصق ، ومحلول التعويم ، ومحاليل الأصباغ أو الكواشف . وتسهل القطارة أخذ كميات صغيرة من هذه المحاليل .

(١١) أحواض الصبغ Staining trough with grooves and cover

وتعرف باسم Coplin jars وهى أحواض من الزجاج ذات تجاويف خاصة ، يمكن أن توضع فيها مجموعة من الشرائح الزجاجية المحملة بقطاعات العينات النباتية بحيث تكون بينها مسافات كافية ، وتملأ هذه الأحواض بالمحاليل المستخدمة فى عملية الصبغ حيث تغمر الشرائح بهذه المحاليل للفترة المطلوبة وتغطى بالغطاء الزجاجى الخاص بهذه الأحواض ، وتستبدل المحاليل حسب الحاجة (شكل ١ - ٢) .

(١٢) زجاجة للكندا بلسم Canada balsam bottle أو لغيره من البيئات الأخرى التى تستعمل فى التحميل .

وهى زجاجة خاصة صغيرة مزودة بقضيب زجاجى رفيع وغطاؤها قبوى الشكل .

ثالثا : الأجهزة

(١) مسطح ساخن Hot plate

يشبه المائدة الصغيرة ومزود بمسخن كهربائى ، تصل درجة حرارته إلى نحو ٤٠° م - ويستخدم أثناء صب عينات الشمع فى القالب أو لفرد القطاعات بعد لصقها على الشرائح (شكل ١ - ٢) .

(٢) فرن شمع Wax oven

ويتركب فرن الشمع من حجرتين السفلية منهما درجة حرارتها تصل إلى ٦٠° م لصهر الشمع (يستخدم شمع البارافين) والعلوية تصل درجة حرارتها إلى نحو ٤٠° م وتستخدم فى تجفيف الشرائح بعد تمام تحضيرها .

(٣) ميكروتوم Microtome

ومنه الدائرى Rotary والثلجى Freezing والمنزلق Sliding ويختلف الاستعمال تبعا

لنوع العينة النباتية وطبيعتها ومهارة الشخص نفسه . حيث يستعمل الميكروتوم الدائرى للعينات النباتية المطمورة فى الشمع فقط ، أما الميكروتوم الثلجى فيستعمل للعينات المقتولة أو غير المقتولة وخاصة الرهيف منها ، وذلك بعد تغليف النموذج من جميع جهاته بمحلول الصمغ وعمل كتلة ثلجية من ثانى أكسيد الكربون الصلب Solid CO_2 تحيط بالعينة فيسهل عملية القطع . ويستخدم الميكروتوم المنزلق للعينات النباتية الصلبة (المقتولة أو غير المقتولة) أو المطمورة فى الشمع أو السللويدن Celloidin .

(٤) ميزان حساس Balance

ويستخدم فى إعداد أوزان الكيماويات الجافة المستخدمة فى تحضير بعض المحاليل الضرورية فى خطوات العمل المختلفة ، وكذلك لوزن الصبغات المطلوب تحضيرها .

(٥) مجهر Microscope

ويستخدم فى فحص وقراءة الشرائح ، ويجب حماية مائدة المجهر بقطعة من الزجاج عند فحص الشرائح أثناء صبغها إذا ما تطلب الأمر التأكد من مدى تأثر الأنسجة بالصبغات المستخدمة .

(٦) جهاز ماء مقطر Distilled water apparatus

(٧) الآلة الدوارة (المائدة الدوارة) Turn table

وهى تستعمل فى برشمة التحضير بطريقة التطويق وفيها يتم لحام الغطاء الزجاجى المستدير بالشريحة لمنع جفاف بيئة التحميل وبذلك يمكن حفظ التحضير بحالة جيدة مدة طويلة من الزمن .

رابعاً : متنوعات

(١) موقد غاز .

(٢) قلم شمع Wax pen

ويستعمل فى كتابة البيانات على الأوانى الزجاجية والشرائح .

(٣) ورق ترشيح ذو مقاسات مختلفة Filter papers

ويستخدم لترشيح بعض المحاليل إذا تطلب الأمر ذلك ، ولإزالة الزائد من محاليل التعويم والصبغ على الشريحة .

(٤) علب خاصة لحفظ الشرائح .

(٥) مجموعة الـكيماويات الخاصة بكـل عملية تبعا لنـوع العينة المراد تجهيـزها والهدف من دراستها مثل الكحولات المختلفة ، والأصباغ ، والشمع وغيرها .

(٦) عدسة مكبرة Hand lens ذات قوة تكبير ٥ أو ١٠ - لفحص العيـنات النباتية والتأكد من سلامتها ، وكذلك لفحص حافة سكين الميكروتوم .

القواعد الواجب اتباعها فى المعمل Laboratory rules

(١) تنظيم محتويات المعمل فى أماكنها الثابتة مع مراعاة النظافة التامة لكل شىء .

(٢) تحديد خطوات العمل بدقـة متناهية قبل البدء فيه أى الوقوف مسبـقًا على ما يجب عمله فى الموضوع تحت الدراسة .

(٣) وضع بطاقات بأسمـاء الزجاجات المختلفة وتركيز كل محـلول أو مادة بها ، ويجب أن تكون الأوانى والأدوات الزجاجية دائمًا نظيفة قبل الاستعمال وبعده .

(٤) العنـاية التامة بنـظافة الأيدى ، مع الاحتـراس الشديد عند اسـتخدام المواد السامـة مثل الفينول Phenol والسليمانى Mercuric bichloride .

(٥) يجب الاحـتفاظ بسجـل لتدوين كـل العمليـات التى تجرى أثنـاء العمل وكـذلك كل الخطوات التى يجب اتباعها فى كل عملية .

(٦) عند تحـضير الأصباغ يـجب أن يتم وزنـها على ورقة نـاعمة حتى لاتـتأثر كفـة الميزان بالصبغة .

(٧) لاتسكب مطلقا شمعًا سائلاً (منصهرًا) فى البالوعة حتى لايتسبب فى انسدادها .

(٨) احترس جيدًا فى حالة اسـتعمال حامض الأوزميك Osmic acid لأن أبخرته المتطايرة تضر بالعين ولذا يذاب بكسر الأنابيب المحتوية عليه تحت الماء .

(٩) يجب أن تكون المحاليل التى ستستعمل فى أى عملية مجهزة ، قبل القيام بإجرائها .

(١٠) لاتعرض زجاجـات الكندا بلسم لـلضوء حتى لايتبخـر الزيلول ، كما أن البـلسم قد يتحول بتأثير الضوء إلى مادة أكثر حموضة وهذه تضر بالصبغة .

(١١) يجب أن تكون الأجزاء النباتية بحالة طازجة Fresh ، كما يجب عدم إحداث أى ضرر لها سواء بالضغط أو بالإلتواء . ويجب أن تنظف تمامًا من أى أتربة عالقة بها بواسطة فرشاة ناعمة .

(١٢) يجب أن توضع الأجزاء النباتية المقطوعة فى محاليل التثبيت فى الحال حتى لايطرأ عليها أى تغير مع عدم تعرضها للهواء لمدد طويلة أثناء تغيير المحاليل .

(١٣) يجب دراسة الطرق المختلفة واختيار ما هى أنسب من غيرها طبقا لحالة الأنسجة المراد دراستها .

(١٤) هناك ملاحظات خاصة بكل عملية يجب تدوينها ومعرفتها لاتباعها .

العناية بالأدوات الزجاجية Glassware

تتطلب خطوات العمل المختلفة بالميكروتكنيك استعمال أدوات زجاجية على درجة فائقة من النظافة سواء كانت هذه الأدوات أوانٍ أو زجاجات أو شرائح أو أغطية شرائح أو غيرها .

فإذا كانت هذه الأدوات الزجاجية حديثة وتستعمل للمرة الأولى فإنه يلزم غسلها جيدًا بالماء والصابون (أو أحد المنظفات الصناعية) ثم إعادة غسلها جيدًا بالماء فقط لإزالة أى أثر للصابون أو للمنظف الصناعى وتجفف بعد ذلك وتحفظ لحين استعمالها ، ويفضل بالنسبة للشرائح وأغطيتها أن تحفظ فى كحول إيثايل بتركيز ٩٥ ٪ لحين الحاجة لاستعمالها .

قد يتطلب الأمر استعمال أدوات زجاجية سبق استخدامها ، فى هذه الحالة تنظف تلك الأدوات بواسطة محلول مكون من بيكرومات البوتاسيوم Potassium bichromate وحامض الكبريتيك المركز Sulphuric acid ويستعمل هذا المحلول بتركيزات مختلفة كما يلى :

(١) المحلول المركز ويتكون من :

٣٠٠ مل	ماء مقطر
٦٠ جم	بيكرومات البوتاسيوم
٤٦٠ مل	حامض كبريتيك مركز

ويحضر هذا المحلول فـى أوانٍ تتحمل درجة الحرارة المرتفعة ، حيـث تذاب بيكرومات البوتاسيوم فى الماء بـالتسخين ثم يترك المحلول الناتج حتى يـبرد ، يضاف إلى هذا المحلول بعد ذلك حامض الكبريتيك المركز ببطء .

(٢) المحلول متوسط التركيز ويتكون من :

٣٠٠ مل ماء مقطر

٦٠ جم بيكرومات البوتاسيوم

٣٠٠ مل حامض كبريتيك مركز

(٣) المحلول المخفف ويتكون من :

١٠٠٠ مل ماء مقطر

٦٠ جم بيكرومات البوتاسيوم

٦٠ مل حامض كبريتيك مركز

عند تنظيـف الشرائح اسقطها الواحدة تلـو الأخرى حتى تتعرض بالكامـل للمحلول ، اتركها لمدة ٢٤ سـاعة على الأقل ثم اغسلها جـيدًا بماء جارٍ حتى يزول كل أثر لـلمحلول . يستحسـن حفظ الشرائح بعد ذلك فى كـحول إيثايل ٩٥ ٪ مع مراعاة إسقـاط الواحدة تلو الأخرى أيضًا .

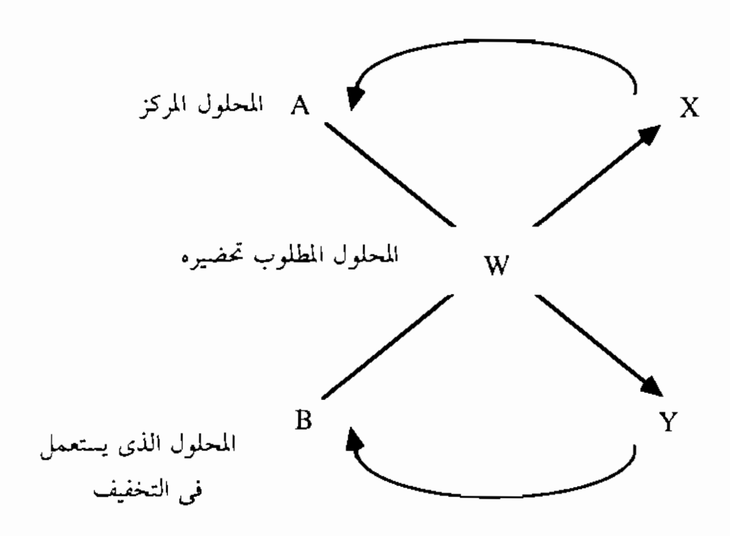
تحضير المحاليل المختلفة Preparation of different solutions

يجـب أن تكـون الأوعية المستخدمة فـى تحضيـر المحاليل زجـاجية ونظيفـة تمـامًا (كالزجاجات والمخابير) وتحضر المحاليل كالتالى :

(١) تحضير محلول من مادة جافة بنسبة مئـوية : أوزن الكمية المطلوبة من المادة وأضف إليها كمية الماء اللازمة .

(٢) تحضير محلول من مادة سائلة (كالفورمالين أو حامض الخليك أو الكحول مثلا) بنسبة مئوية مـعلومة : قس كمية الـسائل فى مخبار مـدرج وأضف إليه كمية من المـاء المقطر لتكمل الحـجم المطلوب على أساس هـذه النسبة الخاصة . مثـال ذلك إذا أردت تحضير محلول من الفورمالين قوته (تركيزه) ٤ ٪ أضف ٤ مل من الفورمالين إلى ٩٦ مل من الماء المقطر .

(٣) استعمل الطريقة السهلة الآتية إذا احتاج الأمر تحضير محلول بنسبة معينة من محاليل محضرة معروفة القوة . وتعرف بطريقة مربع بيرسون Pierson's square (Criss cross) .



حيث :

A تمثل قوة المحلول الذى سيتم تخفيفه (المحلول المركز)

B تمثل تركيز المحلول الذى سيستعمل فى التخفيف

فإذا كان ماء فإن B فى هذه الحالة تساوى صفراً

W تمثل قوة المحلول المطلوب تحضيره

Y تساوى طرح W من A

X تمثل الفرق بين B و W

يخلط X مل مأخوذ من المحلول A مع Y مل مأخوذ من المحلول B للحصول على التركيز المطلوب .

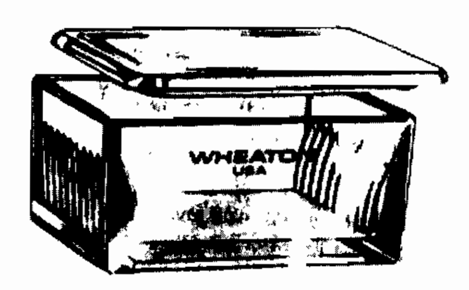
(٤) تحضير التركيزات المختلفة من كحول الإيثايل : يخفف كحول الإيثايل ٩٥ ٪ بالماء المقطر ولايجب استعمال الكحول المطلق فى تحضيرها لغلو ثمنه ، ويمكن تحضير التركيزات المختلفة بالطريقة السهلة السريعة الآتية ، يصب كحول الإيثايل ٩٥ ٪ فى

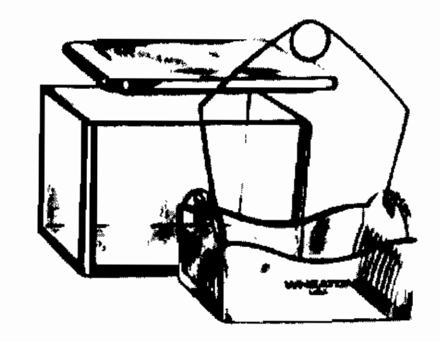
مخبـار مـدرج حتى يصـل الحجـم إلى رقم الـنسبة المطلـوبة ثم أضف ماءً مقـطرًا إلى المخبار ، حتى يصل الحجم إلى النسبة الأصلية من الكحول المستعمل أى ٩٥ ٪ . فإذا أردت أن تحضر كحول ٥٠ ٪ ، صب ٥٠ مل من كحول ٩٥ ٪ فى مخبار مدرج ، ثم أضف ماءً مقطرًا إلى الكحول حتى يصل الحجم إلى ٩٥ مل ، وبذا يتكون كحول قوته ٥٠ ٪ ، وإذا أردت تحضيـر كمية أكبر مـن كحول ٥٠ ٪ حافظ على النـسبة بين الماء المقطر والكحول ٩٥ ٪ . ويؤخذ دائـمًا حجم من كحول الإيـثايل ٩٥ ٪ يمثل التركيز المطلوب ويستكمل بالماء المقطر إلى ٩٥ مل .

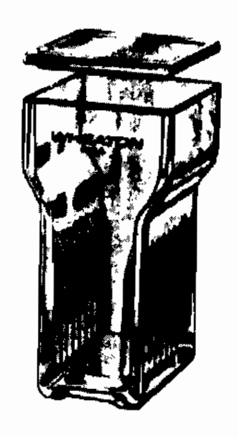
(٥) الزيلول لايختلط بالماء ؛ لذا يجب عند تحضيـر التركيزات المختلفة من الزيلول استعمال الكحول المطلـق . أضـف الكحول المطلق إلى الـزيلول مباشرة بالنسبة المطـلوبة فمثلاً ٧٥ ٪ زيلول تحضـر بأخـذ ٧٥ مل من الزيـلول وإضافة ٢٥ مل من الكحـول المطلق إليها ، ٥٠ ٪ زيلول تحضر بأخذ ٥٠ مل زيلول + ٥٠ مل كحول مطلق وهكذا .

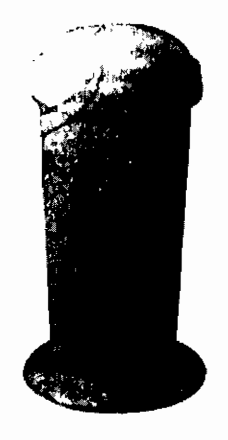


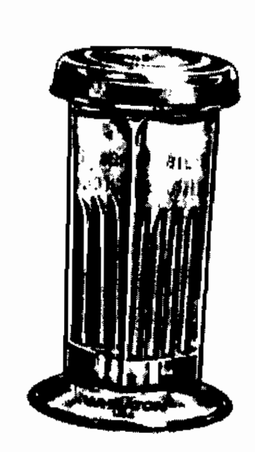
شكل (١ - ١) : بعض أدوات التشريح .



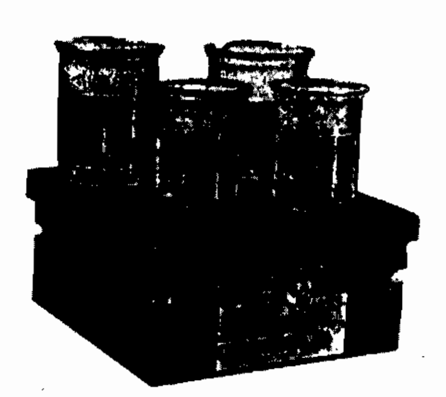




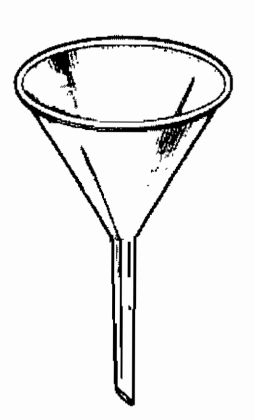




أشكال مختلفة لأحواض الصبغ Coplin jars



Hot plate مسطح ساخن



Funnel قمع

شكل (١ - ٢) : بعض الأدوات الزجاجية والأجهزة المطلوبة بالمعمل .

جمع وتجزئة العينات النباتية

Collecting and Subdividing Plant Materials

يتطلب تحديد المنطـقة التى يجرى عمل قطاعات بها دقة ومهارة تـقوم إلى جانب العلم على الخبرة والممـارسة العملية ، وتعتبر هـذه المرحلة على جانب كبير مـن الأهمية ؛ حيث تتوقف عليها النتائج التى يتحصل عليها الدارس والتى لايجنى ثمارها ويتحقق من توفيقه فيها إلا عند فحصهـا مجهريا ، وهى الخطوة الأخيرة الـتى يصل إليها بعدما يـكون قد بذل من الجهـد الكثيـر ، وتوضح الأشـكال (١ - ٣) و (١ - ٤) و (١ - ٥) و (١ - ٦) طرق الحصول على العينات من الأجزاء المختلفة للنبات ، وفيما يلى بعض النقاط التى يجب على الدارس اتباعها حتى يحقق أفضل النتائج :

(١) يجب أن تكون العينات غضة مطابقة تمامًا للنوع أو الصنف النباتى المراد القطع فيه .

(٢) عـدم إحـداث أى ضرر لـلعينة عند إحضارها ، سواء كانت نبـاتا بأكمله أو جزءًا من نبات .

(٣) إذا لم يكن من الميسور أخذ الـنماذج وقتلها فورًا فيجب حفظ العينـات ونقلها بعناية ؛ بحيث لاتتعرض للهرس أو الجفاف أو الـتعفن ، أو على الأقل إقلال هذه الأضرار إلى حد كبيـر . ويجب عدم استعـمال أنسجة تالـفة إطلاقًا إلا إذا كانت مصـابة بمرض ، ويراد دراستها من الناحية المرضية .

(٤) يجب العناية تمامًا بغسيل العينات والاستـعانة بفرشاة ناعمة ؛ لإزالة ما بها من أتربة ، وذلك قبل البدء فى تجزئتها وأخذ العينات المراد دراستها ، ويستحسن تركها فى حوض به ماء لمدة من الزمن ؛ حتى تستعيد العينات نضارتها .

(٥) يجب استعمال شفـرات الحلاقة الحديثة فى تجزئة العينات لرفع حـافتها وحدتها ، وبذا تقل الأضرار التى قد تنتج عند استعمال آلة قـاطعة سميكة الحافة مثل السكين أو مقص التقليم . وإذا تعذر القـطع لصلابة العينة . . فيمكن التحايـل بالشفرة ، وذلك بعمل مجرى أعمق فأعمق حتى يتم القطع .

(٦) يجب عدم ضـغط أو هرس العينة أثـناء تجزئتها ، وكذلـك عدم جفافها حتـى لايتلف الكامبيوم واللحاء وكذلك القشرة إذا كانت غضة أو حديثة وكذلك الكامبيوم الفلينى .

(٧) يستحسن أن توضع الأجزاء المنتخبة من العينة والمراد القطع فيها لفحص تركيبها فى طبق بترى به ماء ؛ لإعادة تنظيفها قبل تجفيفها ونقلها نهائيا إلى محلول القتل والتثبيت . لاتضع الأجزاء وهى مبتلة بالماء فى محلول القتل ؛ حتى لايقل تركيزه عما يجب أن يكون عليه ، ويجب نقلها إلى محلول القتل بأسرع ما يمكن .

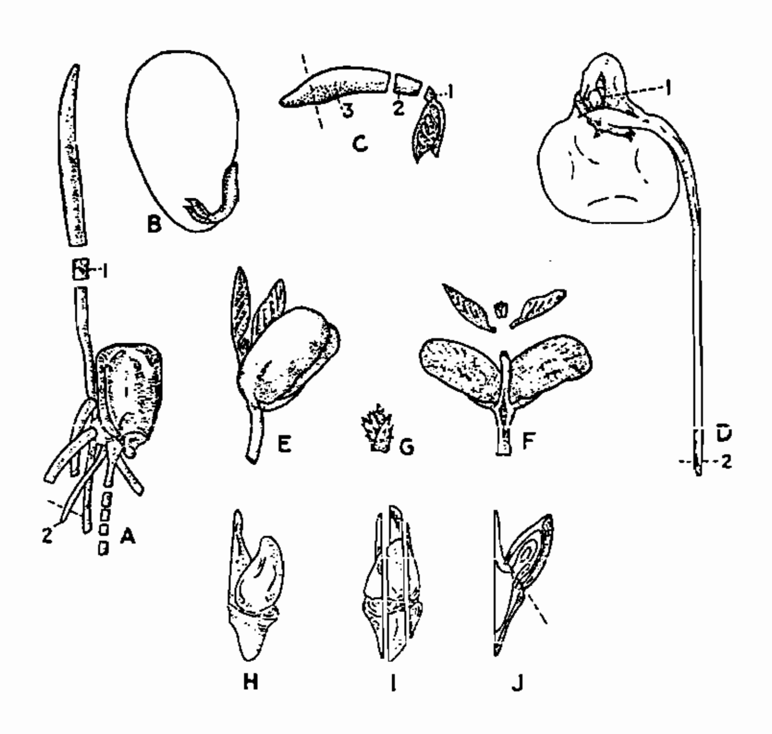
(٨) إذا أردت أن تحفظ العينات بعد إحضارها من الحقل أو الحديقة أو الصوبة لأى سبب فيمكن لفها فى ورق مبلل داخل إناء مغلق وحفظه داخل ثلاجة ، ويجب عدم تركها مدة طويلة داخل الثلاجة ؛ لأنها قد تصاب بالعفن وبذا لاتصلح .

(٩) عند تجزئة العينة إلى الأجزاء المراد معاملتها بالمحاليل المختلفة فى العمليات المتتالية . . يجب ملاحظة عمر العينة وتركيبها - فإذا كانت مسنة وجب تجزئتها إلى أجزاء لاتزيد عن ٢ - ٤ مم طولاً ، وبسمك ٥ - ١٠ مم حتى تتخلل المحاليل العينة بسرعة، أما إذا كانت العينة حديثة السن أمكن تجزئتها إلى أجزاء أكثر طولاً ، قد تصل إلى ١,٥ سم . وفى حالة وجود طبقة سميكة من الكيوتين يجب أن يكون طول الأجزاء أقل ما يمكن (٢ - ٤ مم) حتى يسهل على المحاليل التخلل بسرعة .

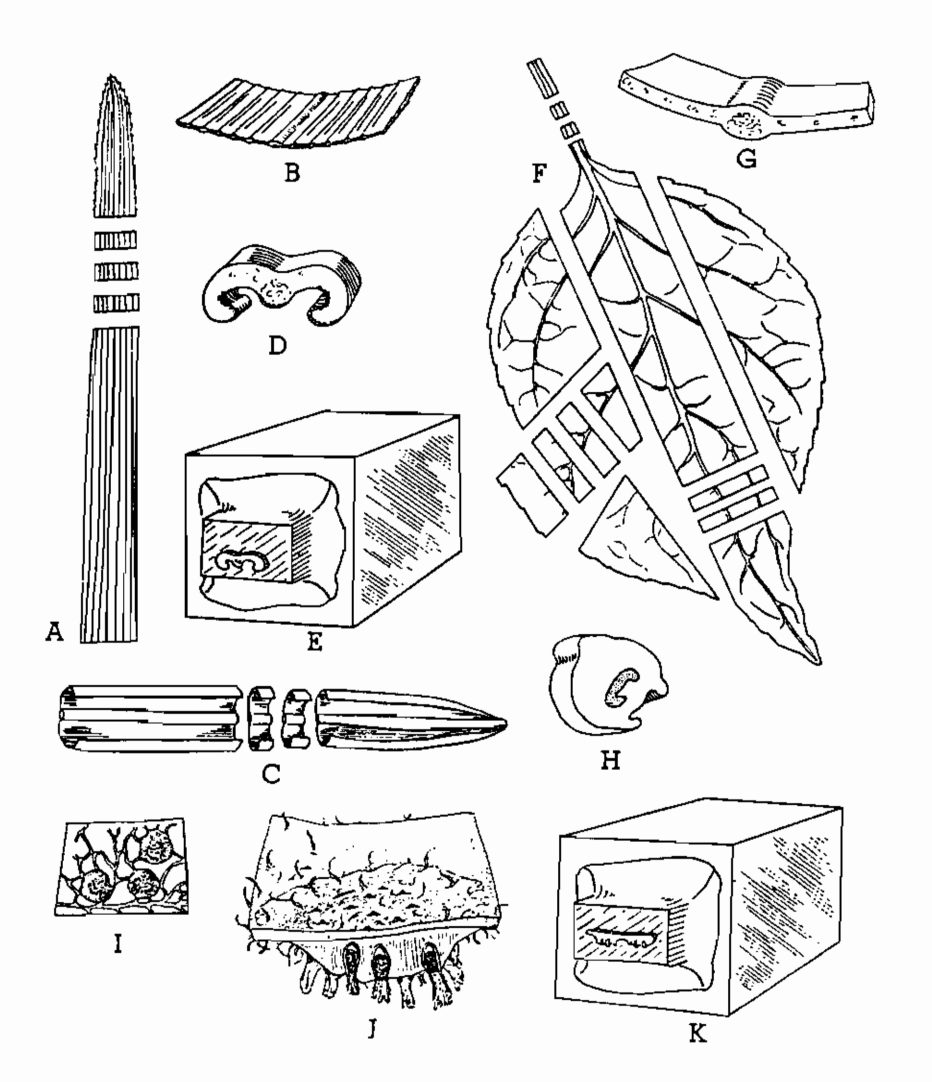
(١٠) يجب عند التجزئة تمييز أحد الأطراف بقطع مائل ؛ لمعرفة الاتجاه عند القطع بالميكروتوم .

(١١) يحسن إسراع عملية القتل بتفريغ الهواء من العينة بواسطة مضخة ؛ خاصة فى الأجزاء الكبيرة والبراعم والأجزاء التى تكثر الزوائد على سطوحها .

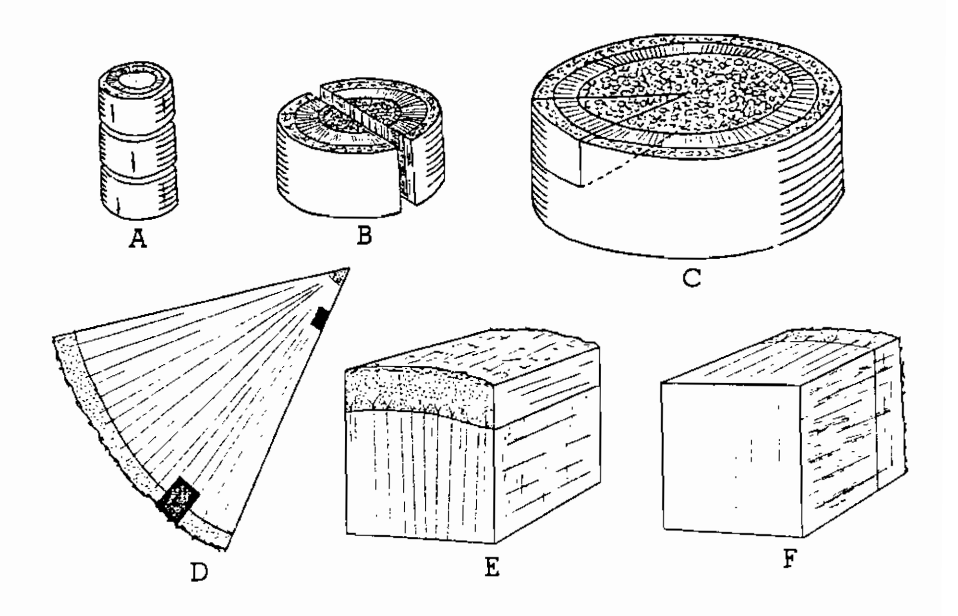
(١٢) يجب كتابة سجل بالأجزاء المختارة من العينات ومواضعها وتاريخ أخذها ، وكذلك محلول القتل المستعمل فى العينة وجميع الخطوات المتبعة فى دراستها .



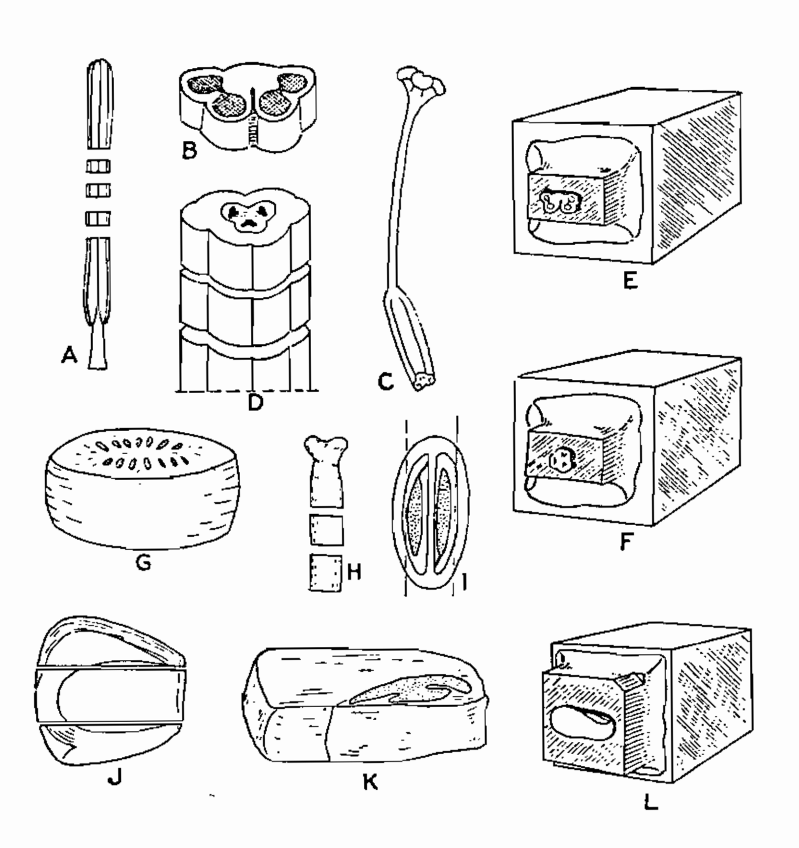
شكل (١ - ٣) : طرق الحصول على المرستيمات القمية : (A) بادرة ذرة حيث تكون القمة النامية للساق لدى عقدة غمد الريشة (1) - وتؤخذ القمة النامية للجذر من أحد الجذور الجنينية (2) - (B) نصف بذرة فاصوليا محتويا على الجنين فى موضعه (C) أجزاء الجنين ، (1) يشتمل على قمة الساق ، (2) تستبعد ، (3) يؤخذ منها قمة الجذر (D) إنبات البسلة ، تؤخذ القمة النامية للساق من السويقة الجنينية العليا (1) - وتوضح (2) القمة النامية للجذر - (E) و (F) إنبات فول الصويا - (G) القمة النامية للساق - (H) و (I) و (J) الحصول على برعم جانبى لأحد الأفرع (ساس Sass ١٩٦١).



شكل (١-٤) : طرق تجزئة الأوراق قبل الترقيد في الشمع : يوضح (A) و (B) و (C) و (D) أوراق ذات نصل طويل وضيق وكيفية الحصول على قطع عرضية منها - (E) جزء من ورقة بعد الترقيد في الشمع والتثبيت على حامل الميكروتوم - يوضح (F) و (G) و (H) ورقة ذات نصل عريض وكيفية الحصول على عينات من النصل والعنق (I) جزء من ورقة عليه نموات فطرية . (J) جزء مكبر لبثرات جرثومية نزعت من الورقة . (K) جزء من ورقة يحمل بثرات جرثومية مطمور في الشمع ، ومثبت على حامل الميكروتوم (ساس Sass ١٩٦١) .



شكل (١-٥) : طرق تجزئة الأعضاء الأسطوانية الضخمة . (A) و (B) و (C) عينات تحتوى على أجزاء تمثل جميع الأنسجة فى المحور . يوضح (D) وضع الأجزاء المأخوذة من أفرع خشبية كبيرة . (E) و (F) الأجزاء المأخوذة من الفرع الخشبى مكبرة - وقد تم تهذيبها (ساس Sass ١٩٦١) .



شكل (١-٦) : تجزئة أعضاء التكاثر . (A) و (B) متك الزنبق - (C) و (D) مبيض الزنبق - (E) و (F) قالب من الشمع للمتك ، والمبيض على حامل الميكروتوم (G) قرص عرضى من ثمرة صغيرة للطماطم . (H) و (I) ثمرة خردلة للمنثور - (J) مقطع طولى لحبة ذرة .(K) الجزء الوسطى للحبة محتويًا على الأجزاء الرئيسية للجنين (L) الحبة بعد الترقيد والتحميل للحصول على قطاعات طولية (ساس Sass ١٩٦١).

٢ . القتل والتثبيت

Killing and Fixation

تعتبر عملية قتـل وتثبيت البروتوبلازم من أهم العمليات فى هذا الـتكنيك . إن عملية إنهاء الحياة داخل الخلايا يجب أن تتم بأقل إخلال ممـكن بالبناء الداخلى للخلايا ، وكذلك أقل تدمير لنظام الخلايا داخل النسيج. بالإضافة إلى قتل البروتوبلازم . . فإن تتابع خطوات عملية القتـل يجب أن يعمل على تثبيت العـينة والحفاظ على المادة النباتية مـتماسكة بدرجة كافية تتحمل معها التداول والعمليات المطلوب إجراؤها عليها . وتهدف هذه الخطوة إلى :

قتل الخلايا فجـائيا وتثبيت محتوياتهـا على حالة أقرب ما تكون من الحالة الـطبيعية ، ولايمكن اعتبار النسيج أصبح مقتولا ما دامت هناك خلية فيه لازالت حية .

صفات المحاليل المستخدمة فى القتل والتثبيت

(١) أن تكون سريعة الانتشار حتى تتخلل الأنسجة وتقتلها بأسرع ما يمكن .

(٢) أن تعمل على تجلط محتويات البروتوبلازم فى حالة دقيقة جدًا حتى لايتأثر مظهره بقدر الإمكان .

(٣) أن تكسب البروتوبلازم صلابة مناسبة فيتحمل المعاملات المختلفة .

(٤) ألا تسبب انكماشا Shrinkage للبروتوبلازم أو تتلف معالمه .

(٥) ألا تؤثر فى قابلية الأنسجة للصبغات بل يجب أن تساعد عليها .

والواقع أن ما يفعله التثبيت هو التأثير علـى بعض محتويات الخلية بحيث يمكن تمييزها عن بـعضها تحـت المجهر ، أى إنه لـو كانت العـملية كـاملة تمام الـكمال فى حـفظ محتويات الخـلية على حالتهـا الحية ، لأصبحت فى الواقع قـليلة القيمة لأنـها لاتعطى فوارق يمكن تمييزها تحت المجهر بسهولة .

ليس لسـائل من السوائل المستـعملة كل المميزات السـابق ذكرها ، لذا تحضر مـحاليل تثبيت Fixatives من مادتين أو أكثـر تخلط معًا Fixative mixture لتعادل الواحدة تأثير

الأخرى أو تكملها فيصبح للمثبت فى مجموعه كل المميزات المطلوبة أو أغلبها على الأقل . فالكحول بمفرده قاتل ومثبت سريع الانتشار ، ولكنه يسبب انكماشًا للبروتوبلازم فيضاف إليه حامض الخليك الثلجى Glacial acetic acid ليعادل هذا التأثير ويمنع الانكماش .

يختلف الوقت اللازم لإتمام عملية التثبيت بإختلاف محلول التثبيت وطبيعته وحجم النموذج المراد تثبيته ، على أنه من الأفضل كقاعدة عامة ألا تقل مدة التثبيت عن ٤٨ ساعة إلا إذا أشير بغير ذلك . والتثبيت يسبق عادة تجهيز القطاعات أو التحضيرات المجهرية الأخرى كالسلخ مثلا ، إلا إنه فى بعض الأحوال يحضر السلخ أو القطاع من الأنسجة الغضة الحية ثم يثبت بعد ذلك قبل الشروع فى خطوات التحضير الأخرى .

محاليل القتل والتثبيت

فيما يلى عرض لخصائص المختلفة للكيماويات المستخدمة فى عملية القتل والتثبيت وأثرها على المكونات المختلفة للخلايا (ويلى Willey ١٩٧١) :

(١) كحول الإيثايل Ethanol

- يحدث تجلط فى السيتوبلازم ويجعله كالشبكة الخشنة .
- يتلف الميتوكوندريا .
- يميل لمزج وإتلاف الحبيبات الدهنية فى الخلية .
- يحدث انكماشًا للنوية .
- يجعل الكروموسومات غير محددة .
- يحدث انكماشًا واضحًا وتقلصًا كبيرًا للخلايا .
- يتوافق مع استعمال حامض البكريك وكلوريد الزئبق (السليمانى) والفورمالدهيد وحامض الخليك .
- يميل لأكسدة حامض الخليك - ويجب تجنب خلطه مع ثلاثى أكسيد الكروميوم وثانى كرومات البوتاسيوم ورباعى أكسيد الأوزميوم .

(٢) حامض البكريك Picric acid

- له خاصية الانفجار (ربما ينفجر فى الزجاجة) لذا يجب حفظه فى وسط رطب (مبلل دائمًا) .
- يحدث تجلط للسائل النووى .
- يحفظ الكروموسومات بصورة جيدة .
- يثبت السيتوبلازم بصورة متجانسة ، ويحدث انكماشًا سيئًا ، ولكنه يترك السيتوبلازم نصف سائل (لين) أى انكماش غير ضار .
- متوافق بدرجة عالية مع المثبتات الأخرى .

(٣) كلوريد الزئبق Mercuric chloride

- سام جدًا وقاتل سريع . عند استخدامه بكميات قليلة يسبب التهابًا حادًا للكلى (ضار حتى فى التركيزات القليلة منه) .
- يحفظ محتويات السيتوبلازم مثل الميتوكوندريا .
- يجعل النوية واضحة جدًا - ويثبت الكروموسومات بصورة ضعيفة .
- يثبت السيتوبلازم بصورة متجانسة ، ولكنه يحدث له انكماش سئ .
- يحدث تشوهات فى الخلية بدرجة أقل مما تحدثه المثبتات الأخرى .
- يحدث اسوداد للنسيج يجب إزالته بفعل اليود فى المحلول الكحولى .
- يجعل الأنسجة أكثر قابلية للصبغ عما تفعله المثبتات الأخرى .

(٤) ثلاثى أكسيد الكروميوم Chromium trioxide

- عند إذابته فى الماء يعطى حامض الكروميك .
- يجب غسل العينات بالماء الجارى للتخلص منه ؛ لأن الغسيل بالكحول يساعد أيضًا على اختزاله .
- يجب استعماله فى الظلام ، لأنه مثبت غير ثابت التركيب فى الضوء ، إذا ترك مدة طويلة فى الضوء فإنه يتحول (يختزل) إلى أكسيد الكروميك الأخضر الذى يصعب ذوبانه بدرجة عالية .

- مثبت ممتاز للكروموسومات ولايثبت الميتوكوندريا .
- مسئول عن جعل السيتوبلازم فى حالة متجلطة خشنة .
- غير متوافق مع المثبتات المختزلة مثل الفورمالدهيد وكحول الإيثايل .

(٥) الفورمالدهيد Formaldehyde

- الفورمالدهيد غاز - والفورمالين Formalin عبارة عن محلول غاز الفورمالدهيد فى الماء بنسبة ٣٧ - ٤٠ ٪ بالوزن .
- يثبت ويحفظ الميتوكوندريا بصورة جيدة ، كما يقوم أيضًا بحمايتها من فعل حامض الخليك .
- لايستخدم فى تثبيت العينات النباتية التى سيتم طمرها فى شمع البارافين (لأنه مثبت ضعيف لهذه العينات) . أما فى حالة العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم الثلجى أو العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم المنزلق فى حالة قطاعات السللويدن فيعتبر مثبتًا جيدًا لها (أى يفضل استخدامه كمثبت لهذه العينات) .
- لايوفر الحماية من الانكماش الحاد وتحطم الخلايا الناتج عن استخدام تكنيك شمع البارافين .

(٦) رباعى أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide

- مثبت جيد فى الحالة الغازية (عندما يكون فى شكل بخار) ، ويجب الحذر من تعرض العين والأنف والفم فى هذه الحالة .
- نفاذيته داخل الأنسجة ضعيفة ، أى يتخلل الأنسجة ببطء ، ولذلك يستخدم فقط مع الأنسجة الرقيقة أو الرهيفة .
- يختزل بسرعة فى الضوء (سهل الاختزال ضوئيا) ، ولذلك يجب أن يتم استخدامه فى تثبيت الأنسجة فى الظلام .
- لايوفر الحماية ضد انكماش وتلف الخلايا المتسبب عن استخدام تكنيك شمع البارافين .

- مثبت هام فى الفحص عند استخدام تكنيك المجهر الإلكترونى .
- غير متوافق مع الفورمالدهيد وكحول الإيثايل .

(٧) ثانى كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate

- مثبت ضعيف بذاته ، ويسبب انكماشًا كبيرًا جدًا للأنسجة .
- بعد انقضاء المدة اللازمة للتثبيت يجب أن تجرى عملية الغسيل فى الماء الجارى ، وذلك لمنع اختزاله إلى أكسيد الكروميك غير القابل للذوبان عند استخدام الكحول .
- يجب حفظه فى درجة حموضة أعلى من ٤ ، فعند حفظه فى درجة حموضة أقل من ٤ تكون الأيونات مشابهة لحالة ثلاثى أكسيد الكروميوم .
- يجعل السيتوبلازم والسائل النووى فى حالة متجانسة .
- يحفظ الميتوكوندريا بحالة جيدة (مثبت جيد للميتوكوندريا) .
- يسبب انحلالاً جزئيًا للنوية .
- يجعل الكروموسومات صعبة الرؤية عند الفحص .
- يتوافق مع استخدام حامض البيكريك وكلوريد الزئبق ورباعى أكسيد الأوزميوم .
- يختزل بواسطة الفورمالدهيد وكحول الإيثايل إلى أكسيد الكروميك .

(٨) حامض الخليك Acetic acid

- يجب حفظه على درجة حموضة ٤ ، وعند حفظه على درجة حموضة أعلى من ٤ فإن استخدامه على هذه الدرجة يسبب تحللاً للأنسجة مع عدم تثبيتها .
- يسبب تقلصًا شديدًا للسيتوبلازم .
- يسبب انحلالاً للميتوكوندريا وجهاز جولجى .
- مثبت ضعيف للسائل النووى . ويثبت الكروموسومات بحالة جيدة .
- يتوافق مع المثبتات الأخرى ، إذا خلط مع ثانى كرومات البوتاسيوم يسبب فعل تثبيتى مثل الذى يحدثه ثلاثى أكسيد الكروميوم .

جدول (٢ - ١) : خصائص المثبتات المجلطة للخلايا Coagulant Fixatives.

الخصائص / المثبتات	كحول الإيثايل Ethanol $C_2 H_5 OH$	حامض البكريك Picric acid $C_6 H_2 (NO_2)_3 OH$	كلوريد الزئبق Mercuric Chloride $H_9 Cl_2$	حامض الكروميك Chromic acid $Cr O_3$
التركيز القياسي	٩٥ - ١٠٠ ٪	محلول مائى مشبع ١,٢ ٪	محلول مائى مشبع ٦ - ٧ ٪	محلول مائى ٠,٥ ٪
خاصية الاكسدة والاختزال	مختزل	مؤكسد	مؤكسد قوى	مؤكسد قوى
التفاعل مع البروتين	مجلط قوى	مجلط	مجلط كامل القوة	مجلط كامل القوة بإضافات
التفاعل مع البروتين النووى	—	يرسب البروتين مع ترك الـ DNA في المحلول	مجلط ضعيف	مثبت جيد ومجلط للبروتين النووى
التفاعل مع الدهون	—	—	يكشف البروتينات الدهنية ولايثبتها	مثبت جيد ومؤكسد
التفاعل مع الكربوهيدرات	—	غير مثبت يربط الجليكوجين إلى البروتين	جيد للسكريات العديدة المخاطية	مؤكسد يتغير ولكن دون تثبيت
معدل النفاذية	سريع جداً	بطئ جداً	متوسط	بطيء
إحداث الانكماش	قوى	قوى وبالأخص بعد شمع البارافين	بسيط	متوسط
إحداث التصلب	حاد	يجعل الأنسجة أكثر ليونة	متوسط	متوسط
التأثير على الصبغات	تغير بسيط	يجعل السيتوبلازم محبًا للحموضة	يجعل السيتوبلازم قابلاً للصبغات القاعدية والحامضية	يجعل السيتوبلازم محبًا للحموضة بقوة
الغسيل	بالكحول	بالماء أو بالكحول	٧٠ ٪ كحول إيثايل ويود	بالماء

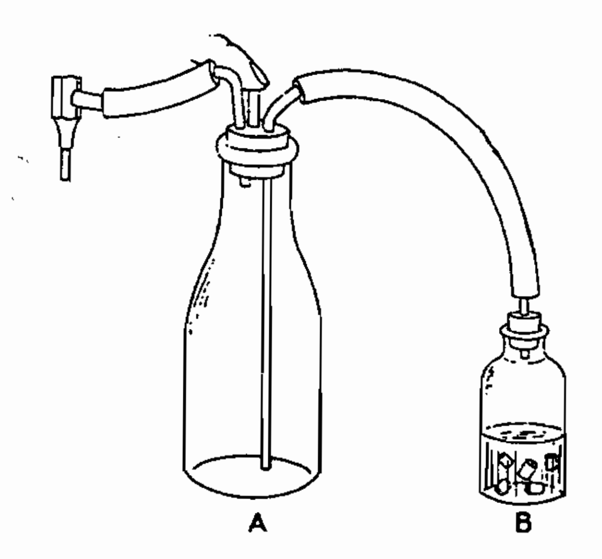
جدول (٢ – ٢): خصائص المثبتات غير المجلطة للخلايا Noncoagulant Fixatives .

المثبتات / الخصائص	الفورمالدهيد CH_2O	رباعى أوكسيد الأرزميوم O_2O_4	ثانى كرومات البوتاسيوم K_2Cr_2O7	حامض الخليك CH_3COOH
التركيز القياسى	٤ ٪ محلول مائى (١٠ ٪ فورمالين)	١ ٪ محلول مائى	١,٥ ٪ محلول مائى	٥ ٪ محلول مائى
خاصية الاكسدة والاختزال	مختزل	مؤكسد	مؤكسد	مؤكسد
التفاعل مع البروتين	غير مجلط ، ثابت ولايذوب فى الماء	غير مجلط	غير مجلط (عند pH أعلى من ٤)	يميه البروتين (يحلل البروتين مائيا) ولايحدث تثبيتا
التفاعل مع البروتين النووى	--	--	يذيب الـ DNA	يرسب البروتين النووى
التفاعل مع الدهون	حافظ جيد	مثبت	مثبت جيد	غير مثبت ويذيب بعض الدهون
التفاعل مع الكربوهيدرات	لايحدث تثبيتا ويصبح الجليكوجين غير حر	--	--	--
معدل النفاذية	متوسط ، ذو فعل بطىء	يتخلل ببطء	سريع	سريع نسبيا
إحداث الانكماش	يحدث إنتفاخات بسيطة أثناء التثبيت وانكماش بعد شمع البرافين	تغير قليل	انكماش قوى بعد شمع البارافين	إنتفاخات وانكماش قوى بعد شمع البارافين
إحداث التصلب	قوى	قوى	ضعيف جدا	ضعيف جدا ويمنع حدوث التصلب الثانى فى الكحول
التأثير على الصبغات	يجعل السيتوبلازم محبًا للقلوية	يجعل السيتوبلازم محبًا للقلوية	متغير مع استجابة جيدة للصبغات الحامضية	السيتوبلازم محب للحموضة والكروموسومات للقلوية
الغسيل	بالماء	بالماء	بالماء	بالكحول

إجراء عملية القتل والتثبيت

تجمع العينات النباتية المطلوب عمل قطاعات مستديمة منها ، مع مراعاة الاحتياطات السابق الإشارة إليها ، وتقطع إلى أجزاء صغيرة تناسب العمليات التالية ، وتوضع فى أنابيب العينات تمهيدًا لإجراء عملية القتل والتثبيت فى الحال . وقد تستخدم زجاجات العينات والتى تحتوى على كميات كبيرة نسبيا من محلول القتل ، وخاصة مع المواد الغضة ذات المحتوى المائى العالى أو كبيرة الحجم ، والتى يمكن أن تحدث تخفيفًا لتركيز المحلول . بعد إجراء الغسيل والتجفيف الجزئى يمكن نقل العينات إلى زجاجات أصغر لإجراء باقى العمليات عليها .

تكون الثغور والثنايا والتجاويف الأخرى لأعضاء النبات محتوية على فقاعات هوائية ، والتى بدورها تمنع تخلل المحلول للنسيج والتشبع به . إذا لم تنغمر الأجزاء النباتية فى المحلول مباشرة فيتم توصيل الزجاجات لمضخة تفريغ ، ويتم تفريغ الهواء من الزجاجات لمدد قصيرة وعلى مرات متتالية ؛ حتى يتم غمر أو سقوط كل الأجزاء النباتية فى المحلول ، أو على الأقل تصبح تحت سطح المحلول إن لم تسقط إلى قاع المحلول . ويتم استخدام زجاجة أمان لمنع الماء من العودة إلى زجاجات العينات . كما أن النقر بلطف على الزجاجة يساعد على إخراج فقاعات الهواء . أما العينات الطافية بطبيعتها . . فيجب أن توضع فى زجاجة طويلة ، تحتوى على محلول القتل ، على أن تظل مغمورة تحت سطح المحلول بواسطة سدادة من الشاش . هذا ويلزم وجود زجاجة ذات فوهة واسعة وغطاء حلزونى محكم ، من أجل إجراء عملية التفريغ للعينات الكبيرة (شكل ٢ - ١) . عندما تصبح كل القطع النباتية مغمورة بعد انتهاء التفريغ ، ادفع القطع الطافية بعد ذلك ، وستجد أن أغلبها ستسقط . قم بعدها بإزالة واستبعاد كل القطع التى تطفو بعد التفريغ والدفع .




شكل (٢ - ١) : إجراء التفريغ لزجاجات العينات المحتوية على محلول القتل .

A - زجاجة أمان مزودة بصمام يدوى.

B - زجاجة العينات.

C - زجاجة كبيرة للعينات الكبيرة.

العينات التى يوجد صعوبة فى تفريغها من الهواء (العينات الصلبة والشمعية والوبرية والبراعم . . . . إلخ) لايتم تخللها أو تشربها بالمحاليل تمامًا ، وعلى هذا يجب إعادة تفريغها قرب نهاية خطوات التجفيف ، ويعاد ثانية فى المرة الأخيرة لتغيير مذيب شمع البارافين وقبل إضافة الشمع . قم بتوصيل زجاجة أمان أخرى بين زجاجة الأمان الاعتيادية وزجاجة العينات ؛ وفائدة هذه الزجاجة الثانية هو منع دخول بخار الماء عند إيقاف مضخة التفريغ ، ويتم ذلك بوضع طبقة عميقة من كلوريد الكالسيوم ، وطبقة من القطن فى هذه الزجاجة . ويمكن استعمال جهاز تفريغ للقتل ، كما يمكن استخدامه للعمليات التالية لغمر العينات فى المحاليل .

تركيب المحاليل المستخدمة فى القتل والتثبيت Fixative mixtures

(١) محلول الفورمالين - الخليك - الكحول

Formalin - Aceto - Alcohol (F.A.A. Solution)

يعتبر .F.A.A من أحسن المحاليل المستعملة فى القتل والتثبيت ، ويمكن ترك الأنسجة فيه مدد طويلة دون أن تتلف .

وهو من المحاليل الممتازة كثيرة الاستعمال لسرعة تخلله الأنسجة النباتية ، ويعتبر المحلول القياسى Standard fixative فى الميكروتكنيك النباتى حيث يفوق استخدامه المحاليل الأخرى - ويحضر كالتالى :

٥٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

٥ مل حامض خليك ثلجى

١٠ مل فورمالين

٣٥ مل ماء مقطر

ويمكن أن يحل حامض البروبيونيك محل حامض الخليك ، ويرمز للمحلول فى هذه الحالة بالحروف .F.P.A .

يستعمل الـ .F.A.A مع كثير من الأجزاء النباتية مثل الجذور المسنة والسوق العشبية الصلبة والأفرع الخشبية وخاصة إذا كانت الدراسة منصبة على ناحيتى الشكل والتركيب ، كما أنه يوافق الأنسجة المصابة إذا كان الميسيليوم داخلها أما إذا كان الميسيليوم سطحيًا فإنه يسبب بلزمة للهيفات الهوائية ، لهذا يستعمل المحلول المائى التالى الخالى من الكحول الذى يسبب البلزمة .

١٠ مل فورمالين + ٥ مل حامض خليك ثلجى + ٨٥ مل ماء مقطر

هناك تركيبة أخرى آخذه فى الإنتشار وهى إضافة بللورات من السليمانى إلى محلول الـ .F.A.A إلى درجة التشبع to saturation فيصبح المحلول ذا مقدرة على التخلل والتجميد الصلب Penetration and hardening كما أنه يفيد فى دراسة الأنسجة المصابة بالبكتريا ، ويجب ملاحظة عدم حفظ الأنسجة عامة فيه لمدة طويلة تزيد عن أسبوع .

طريقة الغسيل

ثبت لمدة ٤٨ ساعة على الأقل ثم انقل إلى كحول إيثايل ٥٠ ٪ أو ٧٠ ٪ وغير مرتين أو ثلاث للتخلص من حامض الخليك والفورمالين (الغسيل Washing) ثم بعد ذلك استمر فى خطوات التجفيف . أما فى حالة وجود السليمانى فانقل النماذج إلى المحلول الأساسى (الـ .F.A.A الخالى من السليمانى) وغيره ثلاث إلى أربع مرات ، وبذا يمكن الحفظ لمدد طويلة إذا أريد ذلك ، وإلا فاتبع الخطوات السابقة للتجفيف بعد إزالة السليمانى (أى النقل إلى الكحول) .

* لاتغسل العينات بالماء بعد هذا المحلول .
* مدة القتل والتثبيت:
  - الأوراق الحديثة : ١٢ ساعة
  - الأفرع الغضة : ٢٤ ساعة
  - السوق الخشبية : أسبوعين على الأقل

(٢) محاليل كروميك - خليك (Chrom - Acetic Fluids)

Chromic acid and Acetic acid Mixtures

يوضح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	محاليل (كروميك - خليك)				
	ضعيف (١)	ضعيف (٢)	متوسط (١)	متوسط (٢)	قوى
حامض كروميك ١ ٪	٣٠	٥٠	٥٠	٧٠	٩٧
حامض خليك ١ ٪	٧٠	٥٠			
حامض خليك ١٠ ٪			١٠	٢٠	
حامض خليك ثلجى					٣
ماء مقطر			٤٠	١٠	

تستعمل المحاليل الضعيفة للأنسجة الرهيفة والغضة مثل الطحالب والفطريات والحزازيات والأطوار الجاميطية للتيريديات والعلبة بالحزازيات القائمة والاجزاء المماثلة سهلة التخلل ، أما المحاليل المتوسطة فتستعمل للقمم النامية ، وتستعمل المحاليل القوية للعينات الخشبية والأوراق الصلبة .

وتتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة النموذج ففى حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء الصغيرة السن مثل الأوراق الحديثة وقمم الجذور فيكفى ١٢ - ٢٤ ساعة أما الأجزاء الكبيرة الحجم فلاتقل المدة اللازمة عن ٢٤ ساعة . وقد لوحظ أن زوال الكلوروفيل بتكسره من السطوح المقطوعة وامتداد ذلك إلى داخل النماذج مقياس طيب على سرعة التخلل وإتمام عملية التثبيت .

هذه المحاليل لاتصلح لتخزين (حفظ) النماذج لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها مدد طويلة ، ولذا يجب إجراء عملية الغسيل والتجفيف بعد مضى المدة اللازمة لإجراء عملية التثبيت . وتغسل النماذج بعد قتلها فى هذه المحاليل بالماء جيدًا لعدة مرات ، والأفضل أن يتم ذلك بإمرار تيار من الماء الجارى . ويجب ملاحظة أن تعامل النماذج الغضة برفق لأن هذه المحاليل لاتسبب تجميد النماذج تمامًا ، رغم إنها تقتلها ، أما النماذج المتماسكة فلايخشى عليها من إمرار تيار من الماء أثناء غسلها .

(٣) محاليل الكروميك - خليك - اوزميك

Chromic, Acetic, and Osmic Acid Mixtures

غالبًا ما تستعمل المحاليل المحتوية على حامض الأوزميك فى الأغراض السيتولوجية وهى تسبب اسوداد للأنسجة ، لذا يجب أن تجرى لها عملية تبييض Bleaching قبل الصبغ ، والمحاليل المحتوية على حامض الأوزميك ضعيفة الانتشار . ولتبييض النماذج توضع فى محلول ٥ ٪ من فوق أكسيد الأيدروجين حتى يتم التبييض .

ويوضح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	محاليل (الكروميك - خليك - أوزميك)				
	Flemming			Chamberlain	Taylor
	ضعيف	متوسط	قوى		
حامض كروميك ١ ٪	٢٥	٥٠	٧٥	٩٦	
حامض كروميك ١٠ ٪					٠,٢
حامض خليك ١ ٪	١٠				
حامض خليك ١٠ ٪		١٠			٢,-
حامض خليك ثلجى			٥	٣	
حامض أوزميك ٢ ٪	١٠	١٠	٢٠	١	١,٥
ماء مقطر	٥٥	٣٠			٨,٣
مالتوز	—	—	—	—	,١٥ جم

يستعمل المحلول القوى من فلمنج فى حالة الأنسجة الصلبة ، أما الضعيف فيستعمل مع الأنسجة الرهيفة . يناسب محلول شمبرلين الطحالب الغضة والفطريات الخيطية والكائنات الحية المماثلة ، ولايصلح للاستعمال مع القمم النامية للجذور أو السوق . يعتبر محلول تيلور من المحاليل المفضلة جدًا لقتل عينات الدهك Smears ويحقق نتائج مرضية للغاية لحفظ التراكيب الكروموسومية ، وتؤدى إضافة المالتوز إلى الحفاظ على هيئة التوابع Satellites وعدم طمس الاختناقات بها .

تتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة النموذج ، ففى حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء الصغيرة العمر مثل الأوراق والقمم النامية فيكفى لها ١٢ ساعة ، أما الأجزاء الكبيرة العمر فيلزم لها مدة لاتقل عن ٢٤ ساعة .

لاتصلح هذه المحاليل لتخزين العينات النباتية لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها لفترة طويلة ، ولذلك يلزم إجراء عملية التجفيف بعد انقضاء الفترة اللازمة لإجراء عملية التثبيت .

وتغسل العينات النباتية بعد قتلها فى هذه المحاليل جيدًا بالماء عدة مرات ، ويفضل الماء الجارى مع العناية بمعاملة العينات الغضة برفق .

(٤) محاليل الكروميك - خليك - فورمالين

Chromic, Acetic, and Fomaldehyde Mixtures

يوضح الجدول التالى تركيب هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	مجموعة ناڤاشين (كراف) Nawaschin type (Craf)						بوين Bouin	مجموعة آلين - بوين Allen - Bouin		
	ناڤاشين	I	II	III	IV	v		I	II	III
حامض كروميك ١ ٪	٧٥	٢٠	٢٠	٣٠	٤٠	٥٠		٥٠	٥٠	٢٥
حامض خليك ١ ٪		٧٥								
حامض خليك ١٠ ٪			١٠	٢٠	٣٠	٣٥		٢٠		٤٠
حامض خليك ثلجى	٥						٥		٥	
فورمالين	٢٠	٥	٥	١٠	١٠	١٥	٢٥	١٠	١٠	١٠
حامض بكريك (مشبع مائيا)							٧٥	٢٠	٣٥	٢٥
ماء مقطر			٦٥	٤٠	٢٠					

يضاف الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة إلى أى تركيبة يقع عليها الاختيار من مجموعة ناڤاشين (كراف) . بعد مدة تبلغ عدة ساعات قليلة من إضافة الفورمالين إلى مخلوط حامض الكروميك وحامض الخليك نجد أن المحلول قد تغير ، وبعد عدة أيام يصير لون الكروميك زيتونيًا أو أخضر ، قبل الوصول إلى هذا اللون تكون عملية القتل قد تمت ، وتصبح وظيفة هذا المحلول المتغير قاصرة على تصلب الأنسجة وحفظها ، ويمكن حفظ الأنسجة فى هذه المحاليل ما يقرب من ٥ سنوات مع محافظتها على إعطاء تحضيرات هيستولوجية ممتازة . وأقل مدة للقتل فى هذه المحاليل [مجموعة ناڤاشين (كراف)] هى ١٢ ساعة ، ويستحسن ترك النماذج لعدة أيام لتكتسب الأنسجة صلابة Hardening ، دون خوف من أى تشويه قد يحدث للأنسجة أو اسوداد فى اللون .

يعتبر محلول بوين Bouin ممتازًا فى قتل قمم الجذور خاصة فى الطور النهائى لانقسام الخلية الذى يعرف بالطور النهائى Telophase ، كما يستعمل بنجاح فى دراسة الأكياس الجنينية Embryo sac . وهو محلول ثابت ويمكن تجهيزه بكميات مناسبة للاستعمال

بالمعمل أو الحقل . وأقل مدة للقتل فى هذا المحلول هى ١٢ ساعة للأجزاء الرهيفة ، أما الأنسجة البالغة فلا تقل المدة عن ٤٨ ساعة .

هذا المحلول لايصلح لحفظ النماذج لذا يجب عقب أن تنقضى المدة اللازمة للقتل غسل النماذج فى كحول ٢٠ أو ٥٠ ٪ أو يتم الغسيل فى الأسيتون ، ولايجب أن تتم عملية الغسيل فى الماء . وعقب الغسيل يجب الاستمرار فى عملية التجفيف .

ينتج عن إضافة حامض الكروميك (فى بعض الحالات يضاف مع حامض الكروميك يوريا) إلى محلول بوين Bouin المحلول المسمى ألين - بوين Allen - Bouin ، وهذا المحلول يستخدم فى الأبحاث السيتولوجية ، ويجب إضافة الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة ، ويصلح هذا المحلول لحفظ النماذج إلى عدة أشهر ، ومن المحتمل أن يتم تصلب النماذج فى هذا المحلول فى مدة تقل عن أسبوع .

(٥) محلول كارنوى Carnoy's Fluid

يتركب من :

١٠ مل حامض خليك ثلجى

٦٠ مل كحول مطلق

٣٠ مل كلوروفورم

يتميز هذا المحلول بقدرته الفائقة على الانتشار حيث يتخلل الأنسجة بسرعة كبيرة ، لذا يمكن استعماله للنماذج الصلبة والشمعية والوبرية التى يصعب انتشار المحاليل الأخرى فيها ، كما يستعمل فى تثبيت الأجسام الحجرية Sclerotia عند فحص تركيبها التشريحى . يتم النقل مباشرة أو بعد ١٠ دقائق على الأكثر إلى كحول مطلق حيث تغسل فيه العينات بتغيير الكحول عدة مرات ، حتى يزول كل أثر لرائحة الكلوروفورم وحامض الخليك ، يتم الترويق فى الزيلول ثم الترقيد فى شمع البارافين .

* تجنب استعمال هذا المحلول عند إختبار الدهون لأن الكلوروفورم يذيبها .

تعطى المحاليل سابقة الذكر « تثبيت حامضى الأثر » مما يحافظ بصورة جيدة وعلى وجه الخصوص على الكروموسومات ، والنويات ، والتركيب المغزلى . بينما يتم تحلل كل من

الميتوكوندريا و البلازما النووية Nucleoplasm ويتم حفظ السيتوبلازم بشكل حبيبى . وتعتبر هذه الصورة هى المفضلة لأغلب الدراسات الخاصة بتركيب النبات .

فى بعض الدراسات السيتولوجية يكون المطلوب الحفاظ على الميتوكوندريا والبناء السيتوبلازمى المصاحب . فى مثل هذه الحالات يستخدم محلول قتل يعطى « تشبيتًا قلوى الأثر » . مثل هذه المحاليل تحفظ الميتوكوندريا والبلازما النووية وفى بعض الحالات تحفظ النويات والفجوات الخلوية بينما يتم تحلل التركيب المغزلى والكروماتين . ولإجراء دراسات دقيقة فى هذا المجال السيتولوجى فعلى الباحث أن يبتكر لنفسه تكنيكًا خاصًا مبنيًا على دراسات موسعة من المراجع . وعلى أية حال يمكن عمل شرائح تظهر فيها الميتوكوندريا بصورة مرضية لأغراض التعليم باستخدام تعديل (Zirkle's) لمحلول (Erliki's) .

Zirkles' modification of Erliki's fluid.

ويتركب من :

٤٠٠ مل   ماء مقطر

٢,٥ جم   بيكرومات البوتاسيوم

٢,٥ جم   بيكرومات الأمونيوم

٢,٠ جم   كبريتات النحاس

يتم التثبيت لمدة تتراوح بين ٢٤ - ٤٨ ساعة ، ثم الغسيل فى الماء ، ثم التجفيف والترقيد فى شمع البارافين .

تعتبر المصطلحات المستخدمة للدلالة على محاليل القتل ملائمة جدًا لإعطاء تعليمات سواء كانت شفهية أو مكتوبة ، وكذلك لتسجيل تسلسل خطوات العمل . وإطلاق اسم عالم على مجموعة من المحاليل التى ابتكرها لا يعتبر دائمًا كافيًا لتعريفها ، وذلك لأن مواصفات المركب لابد وأن تختلف باختلاف العينات ، وتعريف المركب برقم أيضًا لايعتبر وصفًا كافيًا إلا من خلال مجموعة من العلماء المرتبطين معًا . والغرض من المصطلح هنا أن يكون مشتملاً على :

(أ) نوع المركب ويشار إليه عن طريق اسمه أو اختصاره .

(ب) مواصفات المركب ، ويشار إليها بنسب مئوية .

فمثلاً مواصفات مادة صلبة مثل حامض الكروميك يشار إليها كنسبة مئوية بالوزن ، والسوائل مثل حامض الخليك الثلجى السائل فيشار إليه كنسبة مئوية بالحجم . وعلى سبيل المثال فإن أحد مسميات محلول (الكروميك - خليك) هو {C-A 0.5 - 0.5} وتعنى ٠,٥ ٪ حامض كروميك وزنًا ، و ٠,٥ ٪ حامض خليك حجمًا . أحد محاليل تركيبة Nawaschin (Craf) هو {Craf 0.2 - 1.0 - 10.0} ويعنى ذلك أن المحلول يحتوى على ٠,٢ ٪ حامض كروميك و ١ ٪ حامض خليك و ١٠ ٪ محلول فورمالدهيد تجارى . وأحد مركبات Allen - Bouin يعرف بـ {A-B 0.2 - 4.0 - 10.0 - 25.0} ، وهو يحتوى بالإضافة إلى محتويات (Craf) على محلول مائى مشبع من حامض البكريك ٢٥ ٪ حجمًا.

يعتبر النظام السابق للمصطلحات الخاصة بمحاليل القتل دقيقًا وجيد للوصف وملائمًا ، ويستخدمه المبتدئون والمتخصصون بنجاح .

محاليل حفظ النماذج النباتية

كثيرًا ما يحتاج الأمر إلى حفظ الأنسجة والنماذج المعدة للفحص إلى فترة طويلة لحين الحاجة إلى استعمالها . وأكثر محاليل الحفظ استعمالاً الكحول والفورمالين .

١ - الكحول : يستعمل عادة كحول ٧٠ ٪ ، توضع فيه النماذج بعد تثبيتها وتترك لحين الحاجة إليها ، ويستعمل كحول ٨٥ ٪ للنماذج الرهيفة اللينة ، فإن ذلك يساعد على تصلبها وجعلها أصلح للقطع .

٢ - الفورمالين : يستعمل عادة ٥ ٪ فورمالين وهو محلول جيد للحفظ ، وأصلح من الكحول عند حفظ النماذج مباشرة بعد جمعها ، دون تثبيت فإنه قاتل ومثبت لابأس به .

٣ - الفورمالين - كحول : من أجود محاليل الحفظ ويفضل كثيرًا عن استعمال أيهما منفرداً ، ويحضر بالنسب الآتية :

٢ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٧٠ ٪

أو ٥ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪

٤ - الجلسرين - كحول: يستعمل لحفظ النماذج التى يخشى عليها أن تتقصف أو تتصلب عند التحضير ، ويتكون من :

٥٠ مل جلسرين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪

٣ . التجفيف (طرد الماء)

Dehydration

يجب بعد عمـلية الغسيل إزالة كل أثر للـماء وهو ما يعرف بالتجفـيف ، وتساعد هذه العملية بدورها فى الـغسيل ، وتجعل الأنسجة متماسكة ، ويحتمـل أن تصبح صلبة هشة . وتتم هذه العمـلية بمعاملة النماذج بتـركيزات متزايدة من الجوهر الكـشاف ، الذى يطرد الماء وبتركيـزات متناقصة مـــن الماء حتـى يـصل تركيز الجوهر الـكشاف إلى ١٠٠ ٪ ؛ أى التخلص تمامًا من الماء .

وهناك طريقتان لتجهيز النماذج بطـرد الماء وتحضيرها للتشريب بالشمع هما :

الأولى: استعمال كيماويات لطرد الماء غير مذيبة للشمع، ثم بعد ذلك استعمال كيماويات أخرى مذيبة للشمع تعقب الأولى فيما يسمى بعملية الترويق Clearing .

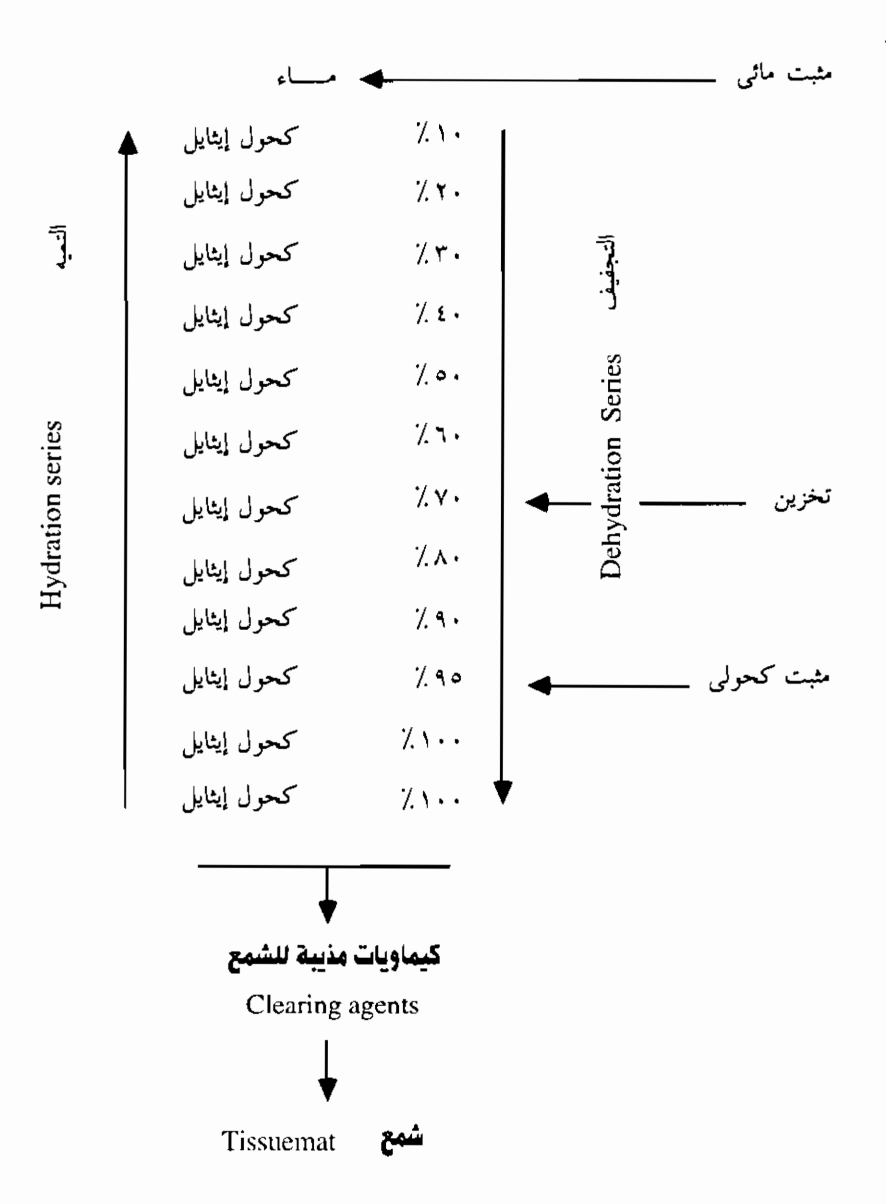
الثانية : استعمال كيماويات تطرد الماء وفى الوقت نفسه تذيب الشمع .

أمثلة للطريقة الأولى لطرد الماء :

حيث تستعمل كيماويات تطرد الماء لكن لاتـذيب الشمع مما يتطلب بعد ذلك استعمال كيماويات أخرى مذيبة للشمع .

(١) استعمال كحول الإيثايل Ethanol

وهو أهم ما يـستعمل فى هذه الـطريقة ، ويمكن أن يـحل محله كحول الأيـزوبروبيل Isopropyl alcohol ، وتتم هذه الـعملية بعمل تـركيزات من الكحول متـدرجة كالآتى : ١٠ ٪ ، ٢٠ ٪ ، ٣٠ ٪ ، ٤٠ ٪ ، ٥٠ ٪ ، ٦٠ ٪ ، ٧٠ ٪ ، ٨٠ ٪ ، ٩٠ ٪ ، ٩٥ ٪ حتى نصل إلى ١٠٠ ٪ وهو الكحول المطلق ، وقد تـكون الخطوات أكثر تقاربًا من ذلك ؛ أى بـفارق ٥ ٪ فقط بـين كل تركيز وآخـر . ويوضح المخطـط (شكل ٣ - ١) تسلسل الخطوات المتبعة فى هذه الطريقة .



شكل (٣ - ١) : مخطط يوضح خطوات التجفيف بواسطة تركيزات متدرجة من الكحول.

ويجب مراعاة تحضير هذه المحاليل حتى تكون معـدة عند الطلب ، وتتم عملية الغسيل بالماء أو الكحول حسـب محلول القتل المستعمل ، ويجب عند إجراء عـملية طرد الماء أن نبدأ بالتركيز الذى يطابق تركيز محلول الغسيل ، فإذا غسلنا بالماء نبدأ بأول تركيز

للكحول ، وهو ٥ ٪ أو على الأكثر ١٠ ٪ ، أما إذا تم الغسيل بالكحول قوة ٥٠ ٪ إذا كان محلول القتل .F.A.A فنبدأ عند التجفيف بتركيز الكحول ٧٠ ٪ .

ويجب أن تتم عملية التجفيف بسرعة ، وألا تترك النماذج لتجف خاصة فى التركيزات العالية لقـــدرتها السريعة علـى التطايـر ، ويجب ملاحظة أن يتم التغيير لـكل أنبوبة على حدة ، والمدة التى تنقضى بين كل تركيز وآخر تتـوقف على حجم وطبيعة النموذج ، وعلى مـدى قابـلية الجـوهر الكـشاف السابق معامـلة النموذج به للـذوبان فى المحاليل المستـعملة للتجفيف .

وفى حالة قـمم الجذور أو الأجزاء الغضة من الأوراق يـكفى ٣٠ دقيقة بين كل عـملية تغيير وأخرى حتـى نصل إلى تركيز ٧٠ ٪ ، ولكن إذا احتوى محلول الـقتل على حامض البكـريك فأطل المدة إلـى ساعة ، وإذا كانت الـنماذج خشبـية صلبة ومـقتولة فى مـحلول .F.A.A فأطل المدة من ٤ – ٨ ساعات حتـى نصل إلى تركيز ٨٠ ٪ ، وتضاعف المدة إذا كانت النماذج كبيرة الحجم .

ويجب مراعاة ما يلى :

(أ) ضاعف المدد السابق ذكـرها بعد أن تصل إلى ٧٠ – ٨٠ ٪ كحول فى التركيزات التالية لذلك .

(ب) يجب تغيـير السدادات عندما تصـل إلى تركيز ١٠٠ ٪ أى كحول مطلـق ، وغيِّر فيه أكثر من مرة لأنه المرحلة الأخيرة لطرد الماء .

(ج) يجب ألا تغسل النماذج أكثر من اللازم فى الماء ، كما يستحسن أن تتم عملية التجفيف فى تركيزات متقاربة القوة حتى لاتحدث بلزمة أو تشويه فى بعض الخلايا .

(د) تلافى ترك النماذج مدد طويلة أكثر من اللازم فـى تركيزات الكحول العالية والخالية من الماء ، حتى لاتصير النماذج هشة أو يحدث انكماش فى الأنسجة .

(٢) استعمال الأسيتون Acetone

يعتبر الأسيتون ممتازًا فى إجراء عملية الـتجفيف ، ويوجد على حالتين : الحالة الأولى وبه نسبة بـسيطة من الماء ويستعـمل فى تحضير التركيزات المـتتالية ، أما الحالة الثـانية فهو

الخالى من الماء Anhydrous وتجرى به عملية التغيير الأخيرة أكثر من مرة للتأكد من طرد الماء تمامًا كما فى حالة الكحول المطلق .

يتبع فى هذه الحالة نفس الخطوات التى اتبعت فى حالة كحول الإيثايل بتركيزاته ، ومن الممكن أن تنقل النماذج من تركيز ما للكحول إلى ما يماثله من الأسيتون دون حدوث أى ضرر ، كما يمكن أن تنقل النماذج المقتولة فى محاليل قتل ، لها تركيز خاص من الكحول إلى الأسيتون ، ذى نفس التركيز ؛ أى نفس نسبة الماء فى كل منهما .

(٣) إستعمال الجلسرين Glycerine

يستعمل الجلسرين فى تجفيف النماذج الرهيفة كالطحالب ، وارتفاع درجة غليانه تساعده على طرد الماء بواسطة التبخير ، ولذا تتم هذه العملية ببطء ، لتلافى البلزمة إلى حد كبير نتيجة للتدرج البطىء فى تركيز الجلسرين ، ويجب أن تغسل النماذج فى الماء جيدًا (لأنها مقتولة فى محاليل الكروميك - خليك) وذلك لأن الجلسرين وتبخر الماء بالتدريج لايزيل أثر البقية الباقية من محاليل القتل من الأنسجة إن وجدت .

ضع النماذج فى محلول جلسرين قوته ٥ ٪ ، ويجب أن تكون كمية السائل كافية بحيث يتبقى بعد التبخير ما يكفى من الجلسرين لتغطية النماذج ، ويمكن أن تتم العملية بوضع النماذج داخل مجفف على درجة حرارة الغرفة ، أو فى فرن درجة حرارته ٣٥ - ٤٠°م ، إذا تغير لون الجلسرين فغيره بآخر من نفس التركيز ، ولتقدير ذلك يجب أن يعين ارتفاع السائل عند الابتداء ، فإذا صار ارتفاعه نصف ما كان قبل التبخر فمعنى ذلك أن قوة تركيز الجلسرين أصبحت ١٠ ٪ وهكذا . بعد تبخر كل الماء تقريبًا تصبح النماذج متماسكة ، وبذا يمكن نقلها إلى كحول مطلق مع تغييره على الأقل مرتين ، استمر فى العملية حتى النقل إلى الشمع .

الترويق Clearing

عقب استعمال أى من الطرق السابق ذكرها للتجفيف (كحول الإيثايل - الأسيتون - الجلسرين) تنقل النماذج إلى أحد مذيبات الشمع ، وتعرف هذه العملية بالترويق ؛ وذلك لأن بعض المذيبات للشمع تكسب النماذج شفافية ملحوظة .

وأهم هذه المذيبات ما يلى :

(أ) الزيلول Xylene (Xylol)

(ب) الكلوروفورم Chloroform

(ج) يمكن استعمال البنزين Benzene والتلوين Toluene ولكنهما لايستعملان غالبًا لانخفاض درجة غليانهما ، وبذا تصبح هناك خطورة من الاشتعال .

وعند استعمال الزيلول يجب أن يكون التدريج فى التركيز بطيئًا فى الأبحاث السيتولوجية ويوصى بعمل ١٠ تركيزات ، أما فى الأغراض التشريحية فيكتفى بالتركيزات ١٠ ٪ ، ٢٥ ٪ ، ٥٠ ٪ ، ٧٥ ٪ ، ٩٠ ٪ ، ١٠٠ ٪ زيلول فى كحول مطلق ، ويكفى من الزمن فى كل تركيز من نصف ساعة إلى ثلاث ساعات على حسب حجم وطبيعة النموذج . ويستحسن أن تطول المدة فى التركيزات العالية ، ويمكن استعمال نفس التركيزات السابقة من الزيلول فى الأسيتون (النقى) .

وإذا استعمل الكلوروفورم فلتكن التركيزات كالآتى :

١/٣ كلوروفورم + ٢/٣ كحول مطلق ثم ٢/٣ كلوروفورم + ١/٣ كحول مطلق ثم كلوروفورم نقى ويغير مرة على الأقل . ومن مميزات الكلوروفورم أنه لايجعل النماذج هشة كالزيلول ، ويمكن الاستعاضة عن الزيلول بالمركب تراى كلوروإيثيلين Thichloroethylene بنفس الطريقة السابقة فى الزيلول . كما يمكن استعمال زيت السيدر Cedar oil ، وهو مروق ممتاز ، وتجرى العملية بصب الكحول المطلق وبه النماذج على زيت السيدر ، فتأخذ النماذج فى الغوص ثم يزال الكحول بماصة ، وبعد مدة تغسل النماذج عدة مرات بالزيلول النقى .

أمثلة للطريقة الثانية لطرد الماء :

(١) كحول البيوتايل Butyl alcohol

يستعمل فى هذه الطريقة كحول البيوتايل العادى N - Butyl alcohol أو الثلاثى Tertiary butyl alcohol - وقد أدخلت هذه الطريقة منذ زمن قريب لإجراء عملية التجفيف والتشريب بالشمع ، وعند استعمال كحول البيوتايل العادى تعمل التركيزات الموضحة فى جدول رقم (٣ - ١).

جدول (٣ - ١) : التركيزات المستعملة من كحول البيوتايل العادى لطرد الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف.

م	التركيز	كحول بيوتايل عادى مل N. Butyl alcohol	كحول إيثايل ٩٥ ٪ مل 95 % Ethanol	ماء مقطر مل Distilled water
١	٣٠ ٪	١٠	٢٠	٧٠
٢	٤٠ ٪	١٥	٢٥	٦٠
٣	٥٥ ٪	٢٥	٣٠	٤٥
٤	٧٠ ٪	٤٠	٣٠	٣٠
٥	٨٠ ٪	٥٥	٢٥	٢٠
٦	٩٠ ٪	٧٠	٢٠	١٠
٧	١٠٠ ٪ (خليط)	٨٥	١٥	--
٨	١٠٠ ٪ نقى	١٠٠	--	--
٩	١٠٠ ٪ نقى	١٠٠	--	--

هذه التركيزات تعطى نتائج ممتازة فى الأغراض التشريحية والهستولوجية ، بعد الغسيل فى الماء تمرر النماذج فى تركيزات من الكحول ، حتى تصل إلى تركيز ٣٠ ٪ كحول إيثايل ومنه تنقل إلى التركيز رقم ١ بالجدول ، وبعد الغسيل مرتين فى كحول تركيز ٥٠ ٪ . إذا كان القتل فى .F.A.A تنقل النماذج إلى التركيز رقم ٣ بالجدول .

يعتبر بعض المشتغلين أن الكحول ثلاثى البيوتايل Tertiary butyl alcohol (T.B.A.) أحسن الجواهر الكشّافة لإجراء عملية التجفيف على الإطلاق ، وهو ذو رائحة مقبولة وغالى الثمن ؛ لذلك لايصح استعماله فى أعمال الترويق التى لاتحتاج إلى دقة فائقة . بعد الغسيل فى الماء أو الكحول نمرر النماذج فى تركيزات من الكحول متدرجة ، حتى نصل إلى ٥٠ ٪ كحول إيثايل ، ثم بعد ذلك تتبع الخطوات الموضحة بالجدول رقم (٣ - ٢).

جدول (٣ - ٢) : التركيزات المستعملة من كحول ثلاثى البيوتايل
لطرد الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف .

م	درجة التركيز	كحول ثلاثى T.B.A. البيوتايل مل	كحول إيثايل ٩٥ ٪ 95 % Ethanol مل	ماء مقطر Distilled water مل	كحول مطلق Absolute Ethanol مل
١	٦٠ ٪	١٠	٥٠	٤٠	--
٢	٧٠ ٪	٢٠	٥٠	٣٠	--
٣	٨٥ ٪	٣٥	٥٠	١٥	--
٤	١٠٠ ٪	٥٠	٥٠	--	--
٥	١٠٠ ٪	٧٥	--	--	٢٥
٦	١٠٠ ٪	١٠٠	--	--	--
٧	١٠٠ ٪	١٠٠	--	--	--

(٢) الديوكسان Dioxan

يكثر استعمال الديوكسان فى عملية التجفيف ، وهو سهل الاختلاط بكل من الماء ؛ حيث يحل محله فى الأنسجة وكذلك شمع البارافين وبالتالى يعطى نتائج تشرب طيبة ، وهو لايحدث بلزمة كالتى تحدثها الكحولات أو الأسيتون ، كما لايجعل الأنسجة هشة Brittle .

وترجع أهمية الديوكسان لما يوفره من وقت ؛ إذ يمكن ترقيد الأنسجة فى الشمع بعد نحو ٤ - ٦ ساعات من التثبيت ، حيث تنقل العينات إلى الديوكسان مباشرة من محاليل بوين أو الفورمالين ، وتجرى ثلاثة تغييرات من الديوكسان خلال ٤ ساعات ، تنقل بعدها العينات إلى شمع البارافين ، حيث يتم التغيير فيه ثلاث مرات بين المرة والأخرى حوالى ٣٠ دقيقة .

يؤخذ على الديوكسان أنه يسبب انكماشًا للأنسجة يفوق الزيلول ، كما أن الديوكسان خطر ؛ حيث تعتبر أبخرته ضارة للإنسان ؛ إذ إنها سامة للكبد ؛ ولذلك يجب استعماله داخل حجرة الأبخرة وتخزينه فى أوانٍ محكمة الغلق . وعمومًا لاتوازى فائدته ما قد ينجم عنه من ضرر .

٤ . الطمر (الصب فى القوالب)

Molding

أولاً : الطمر فى شمع البارافين Paraffin wax embedding routine

عند الـوصول بالعيـنات النباتـية إلى الحالة النـقية لمذيبـات الشمع ، وبعـد إزالة الماء بالتجـفيف (والترويق) تبـدأ عملية التشـريب والترقيد بالـشمع ، ويستخدم لـذلك شمع البارافين إما منفرداً أو مخلوطاً بمواد أخرى .

ويراعى فى شمع البارافين المستخدم توفر الشروط التالية :

(١) أن تكون درجة انصهاره ثابتة ومعروفة وصلابـته مناسبة ، وتتراوح درجة انصهار شمع البارافـين ما بين ٤٨ إلى ٦٢°م ، مع التـجاوز عن درجتى حـرارة لكل درجة انـصهار فمثلاً الشمع الـذى درجـة انصهار ٤٨° م مثلاً تتـراوح درجـــة إنصهاره ما بين ٤٨ - ٥٠°م وهكذا - وعادة ما يستعمل الشمع الذى درجة انصهاره ٥٦ - ٥٨° م ، ويفضل خلال الشتاء شمع درجة انصهاره ٥٤ - ٥٦° م ، وفى الصيف ٦٠ - ٦٢° م .

(٢) أن يكون متجانس القوام والملمس ، مع أقل ما يمكن من التركيب المتبلور أو الحبيبى .

(٣) أن يكون نظيفاً خالياً من الشوائب والماء والزيوت الطيارة .

ويمكن تحسين قوام الـشمع بمنع التبلور ، وتحسـين عملية القطع بإضافـة المطاط والشمع الإسكندرانى (شمع العسـل) إليه ، وذلك بإذابة ٢٠ جم مـن المطاط الخام إلى ١٠٠ جم مـن الـشمـع المـنصهر حـتى درجة التدخـين ، ثم يبرد ويـصب على هـيئة البـلاطة لحين الاستعمال - وبعد ذلك يمكن عمل الخليط التالى :

شمع بارافين	١٠٠ جم
خليط المطاط وشمع البارافين	٤ - ٥ جم
شمع العسل	١ جم

ثم يصهــر الخليط فى الفرن ، ويـترك مدة حتى يصـير متجانسًا ، ويراعـى ترويقه إذا وجدت شوائب - وقد يعد الخليط ويباع تجارياً .

* يستحسن أن يكون المطاط من النوع المسمى مطاط سيلان Ceylon rubber .

* يراعى أن تكون درجة انصهار المطاط مساوية لدرجة التدخين فى الشمع .

التشريب فى شمع البارافين Infiltiration in paraffin wax

ولإجراء عملية التشريب تتبع إحدى الطرق الآتية :

الطريقة الأولى :

توضع العينة النبـاتية بعد التجفيف والترويق فى زيلول جـديد ، فى أنبوبة ذات حجم مناسب ٢ × ٥سم وغطاء فلين ، وتضاف قشور رقيقة مـن الشمع إلى الزيلول حتى يتوقف ذوبان الشمع على درجة حرارة الغرفة وتترك ٢ - ٤ سـاعات ، ثم تنقل الأنبوبة إلى الغرفة العلوية من فرن الشمع ، وهى الغرفة المخصصـة لتجفيف الشرائح ، وتتراوح درجة حرارتها بين ٣٥ - ٤٠° م . يضاف مزيد من الشمع على فتـرات (كل ساعة مثلاً) حتى تصبح قوة تركـيز الشمع نحـو ٥٠ ٪ تقريباً ، وتترك لمـدة ٤ ساعات - تنـقل الأنبـوبة إلى فرن الشمع (٦٠° م) دون نزع غطائها وتترك ٢٤ ساعة مع إضافـة كمية من الشمع ، إذا تطلب الأمر ذلك (بعد ٦ ساعات مثلاً) - ينزع الغطاء وتضـاف كمية أخرى من الشمع وتترك الأنبوبة دون غطاء لمدة ٢٤ ساعة ، حيث يتبخر معظم أو جميع الزيلول . يسكب الشمع الذى يعلو العـينات النباتية ويضاف شمع نقى وتترك ٢٤ ساعة . يستبدل الشمع النقى مرة أو مرتين ، ويترك فـى كل مرة ٢٤ ساعـة ، بعد ذلك يكـون تشريب الأنـسجة بالشـمع تاماً وتـصبح العينات معدة للصب (الطمر) فى القوالب .

الطريقة الثانية :

كثافة بعض مذيبـات الشمع أقل من كثافة الشمع ، وبذلك تطفـو عليه إذا ما أضيفت إلى شمع متجمد ، لكن من الممكن أن يطفو الشمع على كحول البيوتايل العادى NBA أو كحـول البيوتايـل الثلاثـى TBA بإضافـة الكلـوروفورم بنسبة ١٥ ٪ إلــى NBA و ٢٥ ٪ إلـى TBA كما أن كثافة الشمع أعلى من كثافة الزيلول ، ولكن يمكن إضافة الشمع منصهراً إلى جدران الأنبوبة فيكون طبقة متماسكة من الشمع على سطح المذيب .

يضاف ما يوازى ملء ملعقة صغيرة شمع بارافين منصهر إلى المذيب النقى ، وهو بارد وبه العينات النباتية ، فيكون الشمع طبقة متماسكة أعلى المذيب ، وتترك الأنابيب على درجة حرارة الغرفة ، ثم تنقل إلى الفرن العلوى (٣٥ - ٤٠° م) ؛ حيث لا ينصهر الشمع بل يذوب وينتشر إلى أسفل حيث العينات النباتية . إذا ما تم ذوبان الشمع يضاف كمية أخرى من شمع منصهر ، وتستمر عملية الإضافة حتى تتكون طبقة من الشمع لا تذوب على السطح ، وبالتالى يكون المذيب قد تشبع بالشمع على هذه الدرجة . لا تخش من تلف العينات إذا طالت مدة هذه العملية ٢ - ٣ يوما .

تنقل الأنابيب إلى فرن الشمع ، وبذلك تنصهر الطبقة السطحية المتماسكة ، وتستمر عملية التشريب بالشمع والتى بدأت على درجة ٣٥° م ، بعد مضى نحو ٤ ساعات يصب نصف الكمية الموجودة فى الأنابيب ، وتستبدل بكمية مساوية من الشمع النقى ، وتكرر هذه الخطوة ٤ - ٥ مرات ، فى النهاية يسكب الشمع المصاحب للعينات ، ويستبدل بآخر نقى ، وتعاد الأنابيب إلى الفرن سريعاً ، تكرر هذه الخطوة ٢ - ٣ مرات لتمام التأكد من التخلص من كل أثر للمذيب ، وعند تمام التخلص من المذيب لا يكون الشمع دهنى الملمس .

الطريقة الثالثة :

تستعمل فى حالة عدم إضافة الكلوروفورم إلى كحول البيوتايل العادى أو الثلاثى لرفع كثافته ، وتجرى بنقل النماذج إلى خليط من البيوتايل وزيت البارافين بنسبة ٥٠ ٪ لكل . تترك النماذج فيه على الأقل لمدة ساعة ، ثم يصب ملء نصف أنبوبة بالشمع المنصهر وتترك حتى يبدأ الشمع فى التماسك ، ثم تسكب النماذج وما عليها من خليط على هذا الشمع المتصلب ؛ بحيث تكون النماذج مغطاة بالخليط ، وتترك فى جو الغرفة العادى ، يذيب البيوتايل الشمع فتأخذ النماذج فى الغوص إلى أسفل ببطء ، وبذا يحدث التشريب تدريجياً ، ثم تنقل الأنابيب إلى الغرفة العلوية من الفرن ، وتترك لمدة ١٢ ساعة حتى يصبح الخليط والشمع سائلا . تنقل الأنابيب إلى الفرن ، وتنزع الأغطية ، فيبدأ الكحول فى التطاير ويزداد تركيز الشمع ، بعد ٤ - ١٢ ساعة يستبدل هذا الخليط بشمع نقى ، وتكرر هذه العملية مرتين أو ثلاث كل ٦ ساعات ، ثم يعمل اختبار مضغ قطعة شمع للتأكد من زوال كل أثر للمذيب .

الترقيد فى شمع البارافين Embedding in paraffin wax

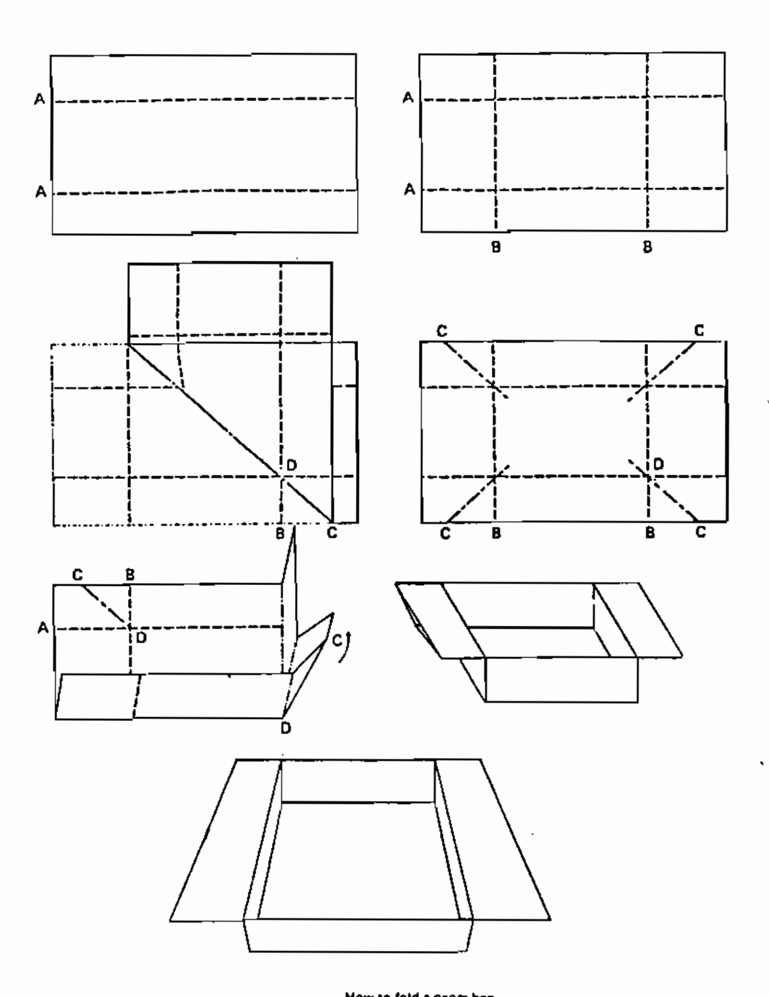
تسكب العينات النباتية بما حولها من شمع منصهر بعد تمام تشريب العينات بالشمع فى قوالب خاصة ، قد تحضر من الورق المقوى (شكل ٤ - ١) ، أو قد تستعمل قوالب معدنية ، وأحياناً تستعمل قوالب الثلج البلاستيك الموجودة مع الثلاجات ، كما قد تستعمل زجاجات ساعة بحجم مناسب .

ولإجراء هذه العملية يفضل إضافة طبقة رقيقة من الجلسرين على السطح الداخلى للقالب ، حتى يسهل فصل قوالب الشمع بعد تجمدها - توضع القوالب على سطح ساخن Hot plate ويضاف طبقة شمع رقيقة ، ثم توضع بطاقة بيانات صغيرة مقلوبة بأحد الأركان ، ثم تصب محتويات الأنبوبة من شمع منصهر به العينات النباتية ، ويراعى أن يغطى الشمع العينات تمامًا وإلا يضاف كمية مناسبة من شمع منصهر ، وتنظم العينات فى الوضع المناسب بواسطة إبرة تشريح دافئة ، مع ترك مسافة مناسبة بين كل عينة وأخرى ؛ ليمكن تجزئة القالب مستقبلاً إلى قطع صغيرة ، تحتوى كل منها عينة واحدة للقطع فيها ، ويراعى عدم تصلب الشمع حتى تمام تنظيم العينات .

يبدأ سطح القالب فى التجمد أولا ؛ حيث تتكون طبقة رقيقة صلبة على السطح ، ويرفع القالب بعيداً عن السطح الساخن ، ثم يوضع القالب بإناء به ماء بارد ليتصلب . وقد يتطلب الأمر أحياناً إمرار لهب على سطح الشمع للتخلص من أية فقاعات هوائية تتكون داخل الشمع . عند بدء تصلب الشمع يغمس داخل الماء لتمام التصلب ، ويمكن وضع ثقل مناسب فوق القالب .

يتماسك الشمع ويصبح بيئة متجانسة نصف شفافة ، أصلح ما تكون لإجراء القطع ، تنزع قوالب الشمع من قوالب الورق ، ويمكن استعمال القوالب الورقية مرة أخرى ؛ حيث إن تشربها بالشمع يجعلها أفضل للاستعمال حيث يكون سطحها مصقولاً .

يراعى ألا يترك الشمع يبرد تدريجياً ؛ حتى لا يتبلور ويصبح غير صالح للقطع ، ولايضاف شمع إلا بالقدر الكافى لتغطية العينات ؛ لأن القوالب السميكة تكون صعبة التماسك . أضف إلى ذلك الإسراف فى استعمال الشمع وسرعة استهلاك محاليل إزالة الشمع فى الخطوات التالية .



شكل (٤- ١) : كيفية عمل قالب من الورق المقوى لطمر العينات النباتية فى شمع البارافين (ويلى Willey ١٩٧١) .

إذا ظهر أى عيب بالقوالب بعد صبها يمكن إعادة هذه العملية مرة أخرى Recasting ؛ حيث تقسم قوالب الشمع إلى قطع تحتوى على العينات النباتية ، وتوضع فى أنابيب تعاد إلى الفرن مع عمل تغييرتين من الشمع للتخلص من الشمع السابق صبه وتكرر الخطوات السابقة .

قد تظهر بعض المشكلات أثناء عملية التقطيع بالميكروتوم ، نتيجة عدم إجراء التشريب بالشمع على الوجه الأكمل ، ولمعالجة ذلك يلزم **إعادة عملية التشريب بالشمع Reinfiltration** بشرط ألا يكون قد لحق أى ضرر بالأنسجة ، ويتم ذلك بإزالة الشمع بقدر الإمكان من حول العينات ، دون المساس بها ووضعها فى أحد مذيبات الشمع ، وتركها على درجة ٣٥° م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم تنقل بعد ذلك إلى داخل الفرن ، وتجرى عملية تشريب بالشمع من جديد كما سبق ذكره .

ثانياً : الطمر فى السللويدن Celloidin embedding routine

تستعمل هذه الطريقة لعمل قطاعات فى النماذج الصلبة أو الهشة ، التى لا يصلح شمع البارافين كدعامة لها . ومن الأمثلة على ذلك منطقة التحام الأصل بالطعم والأنسجة المصابة التى تكون متهتكة ، وكذلك عند عمل القطاعات فى الأشجار الكبيرة . والسللويدن أحد أشكال النتروسليولوز ، والمذيب المستعمل له عادة عبارة عن الاثير وكحول الميثايل بنسب متساوية . والمعتاد تحضير ٥ تركيزات من محلول السللويدن وهى ٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠ ٪ وتتلخص عملية التشريب بالسللويدن فى نقل الأنسجة التى سبق قتلها وطرد الماء منها إلى محلول مخفف من السللويدن ، وزيادة تركيز السللويدن تتم بعدة طرق ، وفيما يلى شرح لإحدى هذه الطرق :

تجرى عملية طرد الماء من العينة باستعمال تركيزات متدرجة من كحول الإيثايل حتى الوصول إلى الكحول المطلق ثم إلى المذيب حيث تبقى مدة ساعة إلى عدة ساعات ثم تنتقل إلى محلول ٢ ٪ سللويدن ، بحيث يكون حجم المحلول ٥ أمثال حجم النموذج على الأقل ، ثم تقفل الزجاجة بسدادة تثبت بسلك ، ثم توضع الزجاجة فى فرن على درجة ٣٥ - ٦٠° م . وعلى فترات تتراوح بين ٢٤ ساعة للنماذج التى سمكها ٣ - ٥ مم إلى يومين أو أكثر للنماذج الأسمك من ذلك ، يغير المحلول بمحلول آخر أكثر تركيزاً ، وذلك بإخراج الزجاجة من الفرن وتبريدها ، واستبدال محلول ٢ ٪ بآخر ٤ ٪ ، ثم نعيد قفل الزجاجة ووضعها فى الفرن بالتالى ، ثم تكرر هذه العملية لمحلول ٦ و ٨ و ١٠ ٪ ، وبعد ذلك

نضيف قشوراً رقيقة من السللويدن للزجاجة كل ٢٤ ساعة ، وعندما يصبح السللويدن سميكًا لدرجة أنه يسيل بصعوبة على درجة حرارة الغرفة يكون صالحًا لعمل قالب ، ويمكن التأكد من ذلك بوضع عود ثقاب جاف داخل محلول السللويدن ، فيأخذ معه كمية من السللويدن .

يتم إعداد قالب السللويدن برفع جزء من النموذج ، وحوله كتلة من السللويدن السميك ، ثم يغمر فى الكلوروفورم فيتصلب السللويدن فى الحال ، ويكون شفافًا ، ويحسن ترك الكتلة فى الكلوروفورم لمدة ١٢ ساعة ؛ حتى يتم تصلب الأجزاء الداخلية ، ثم ينقل النموذج بعد ذلك إلى محلول من أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥٪ والجلسرين ؛ ليحفظ فيه استعداداً لعملية القطع .

ثالثاً: الطمر المزدوج فى السللويدن وشمع البارافين

تتلخص هذه العملية فى تشريب الأنسجة بالسللويدن ثم فى شمع البارافين . وتستعمل هذه الطريقة فى حالة النماذج المحتوية على أنسجة صلبة مع وجود مناطق هشة سهلة التكسر ، مثل سوق بعض الحشائش التى بها مناطق تحتوى على خلايا اسكلرنشيمية ملجننة بشدة ؛ مما يستدعى الأمر وجود دعامة أقوى من التى يمكن الحصول عليها من شمع البارافين . لذلك تجرى عملية الترقيد فى السللويدن بإجراء عملية التصلب ، ثم يزال السللويدن المحيط بالنموذج ، مع تعريض الأسطح المقطوعة وعدم التعرض للأجزاء المحتوية على البشرة ، ثم تجرى عملية التشريب فى شمع البارافين ، وبهذه الطريقة يمكن إجراء عملية القطع باستعمال الميكروتوم الدوار والحصول على شريط .

رابعاً: الطمر فى أشباه شموع تذوب فى الماء

هناك طريقة وسط ما بين طرق طمر النماذج فى الشمع أو السللويدن ، وقطع النماذج دون طمر . ويستعمل فى ذلك مركبات صناعية تشبه الشمع ، ولكنها تذوب فى الماء مثل مركب Glycerol monostearate الذى ينصهر على درجة ٥٥° م .

تنقل النماذج الحية أو المقتولة من الماء مباشرة إلى المادة المستعملة المنصهرة (Glycerol monostearate) ثم توضع فى الفرن لمدة ٤٨ ساعة تغير أثناءها ٦ مرات ، ولا يحدث أثناءها تشرب كامل للأنسجة ، ولكن تكتسب النماذج صلابة ؛ وبذا يمكن عمل قطاعات جيدة رقيقة بواسطة الميكروتوم المنزلق . وتنقل القطاعات إلى الكلوروفورم ، ومنه إلى الكحول ومن الأخير للصبغة .

٥ . الميكروتومات

Microtomes

عرفت أجهزة تقطيع العينات لأول مرة خلال النصف الثانى من القرن الثامن عشر ، وكان يطلق عليها آلة التقطيع cutting machine ، وفى عام ١٨٣٩ أطلق شيفاليه (Chevalier) عليها لفظ ميكروتوم Microtome أى آلة القطع الدقيق . ولقد أدخلت على الميكروتومات عديدًا من التعديلات كانت فى البداية تتناسب مع المجهر الضوئى حيث كانت تعطى قطاعات حتى سمك ٥ ميكرون تقريبا ، إلا أن هذه القطاعات وإن كانت تتناسب مع الفحص بالمجهر الضوئى إلا إنها تعتبر سميكة جدا للفحص بالمجهر الإلكترونى ، وفى الخمسينات من القرن العشرين تطورت الأشكال والطرز المختلفة للميكروتومات مما ساعد على ظهور أنواع منها تتمكن من عمل قطاعات رقيقة جدا (أقل من نصف ميكرون) تتناسب مع الفحص بالمجهر الإلكترونى .

توجد طرز مختلفة من الميكروتومات مثل الميكروتوم الدوار Rotary microtome والميكروتوم المنزلق Sliding microtome والميكروتوم الثلجى Freezing microtome والكريوستات Cryostate والميكروتوم الفائق Ultra microtome ، ويختلف استخدام كل منها تبعا للنموذج وحالته والشخص ومهارته ونوعية الدراسة . ويستعمل النوع الدوار للعينات المطمورة فى شمع البارافين ، أما المنزلق فيستعمل للعينات الحية الصلبة المقتولة ، وغير المقتولة ، أو المطمورة فى الشمع أو السللويدن ، أما النوع الثلجى فيستعمل فى حالة العينات الحية المقتولة ، وغير المقتولة وخاصة الرهيف منها ، والتى يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع ، ولقد تم تطوير الكريوستات لعمل قطاعات سريعة رقيقة مفككة لاستخدامها فى دراسة كيمياء الأنسجة ؛ حيث تقطع العينات بعد تجميدها دون تعريضها لدرجات حرارة عالية أو مذيبات الدهون . كما تم تصميم الميكروتوم الفائق لعمل قطاعات رقيقة جدا أقل من نصف ميكرون تناسب الفحص بالمجهر الإلكترونى .

أولاً : الميكروتوم الدوار لقطاعات شمع البارافين

Rotary microtome for paraffin sections

تعمل معظم الميكروتـومات الدوارة بطريقة متشابهة حيث تتحرك العـينة المثبتة جيدا فى الماسك عبر حافة السكينة الثابتة ، ويكون الـتقدم محكمًا بحركة الوتد خلال مسطح مائل أو بواسطة حـبل عمود الإدارة ، ويتم التـحكم فى السمـك عادة مقدرا بالميكـرون بداية من ١ ميكرون . ويجب حفظ المـيكروتوم نظيفًا دائمًا ، ويراعى تزييته بانتـظام ويتسبب أى تآكل فى الأجزاء فى خلل فى حركته وينتج عنه قطاعات تالفة . وسكينة الميكروتوم Microtome knife ذات نصل حاد ، وللاحتفاظ بحافة حادة للنصل يراعى تكرار عملية السـن على فترات مناسبة ، ويجدر بالإشارة أن النصل إذا تلف يصعب إصلاحه ، لذلك اتجهت بعض المعامل إلى إنتاج أمـواس (شفرات حلاقة) ومواسك خـاصة لاستعمال الطـلبة لفترة قصـيرة يتم بعدها التخلص منها .

بالإضافة إلى الميكروتوم والسكين يتطلب الأمر توفر الأدوات التالية :

(١) فرشة رسم صغيرة A small paint brush .

(٢) عدد من الملاقط Forceps .

(٣) العديد من المسطحات المستوية Several flat لاستقبال شرائط الشمع بعد التقطيع .

(٤) علب كرتون مـن الورق المقوى Cardboard boxes لحفظ شرائط الشمع قـبل تحميلها على الشرائح .

(٥) زجاجة كلوروفورم صغيرة A small bottle of chloroform .

(٦) فرشاة رسم $\frac{١}{٢}$ بوصة A $\frac{1}{2}$ - inch paint brush لإستخدامها فى إزالة أشرطة الشمع الزائدة وغير المرغوب فيها .

الإرشادات الأساسية للميكروتوم الدوار

Basic directions for the rotary microtome

(١) يجب أن يكون الميكروتوم نظيفاً عند البدء فى العمل . ويراعى التخلص من كل شرائط الشمع المـوجودة بالفرشاة . اختـبر أداء عجلة اليـد ، إذا كانت صعبة الحركـة فيجب

تزييتها ثم نظف الأجـزاء الداخلية للآلة ، واطمئن على ميكانيـكية التشغيل . إذا كان ماسك الحركة عند نهايته فيجب إرجاعه بالكامل مع ضبط الميكانيكية.

(٢) ثبت عجلة اليد أو اتركها فى الوضع الذى يكون عنده الماسك فى أعلى وضع .

(٣) ثبت العينـة بماسك القالب الشمعى ثـم اضبط السطح المربع لقالـب الشمع (الذى به العينة) رأسيا وأفـقيا بحيث تكون حافتاه العلـوية والسفلية موازيتين لبعـضهما البعض وتكونا موازيتين لقاعدة الميكروتوم ، ويجب أن يكون معلوماً أن الدقة فى ضبط القالب فى بداية العمل هامة جداً لنجاح عملية القطع .

(٤) امسح نصل سكين الميكـروتوم بعناية بالكلوروفورم لتنظيف حافـته . ثم ثبته فى ماسك النصل (أو الماسك وبداخله شفرة الحلاقة) . اختبر بعناية زاوية النصل وثبات وضعه فـى الماســك والمســافة بين قالب الشمع وماسك القالب ، وزاوية خط المركز للنصل (شكل ٥ - ٨) والتى فى مواجهة القالب يجب أن تكون حوالى ٢٠^{o} .

(٥) يجب أن تكون الحافة العلوية والسفلية لقالب الشمع متوازيتين مع بعضهما البعض ومع حافة السكينـة . وإذا كان من الضرورى إعادة ضبط قالب الشمـع فيجب أن يتم ذلك بحرص ؛ حيث إن تهذيـب القالب يتم بواسطة شفرة الحلاقة . فلا تـسمح للشفرة أن تلامس حافة نصل السكين حتى لا تتعرض أصابعك للإصابة حيث يكون النصل حادًا جدا .

(٦) افتح عـجلة اليـد واخفض قالـب الشمع حـتى يصبـح وجهه فى مـستوى حافـة نصل الميكروتوم . افتح النصل وحركه ببطء فى مواجهة القالب وأوقفه دون أن يلامس وجه القالب ثم أعد قفل نصل السكين جيدا فى مكانه .

(٧) اضبـط مقياس سمك التقطيـع حسب الرغبة ، يفضل البـدء عند سمك ١٠ ميكرون . عند استـعمال ميكروتــوم له عجلات مســننة Ratchet wheels تقوم بتحـديد سمك القطاع ، لا تضبط السمك فى منتصف التدريج . اضبطه دائما عند وقفة كاملة (تكة) لتجنب تلف الأسنان .

(٨) يراعى تحريك عجلة اليد بصورة منتظـمة ، اسمح لحوالى ١٠ سم من شريط الشمع بأن تتحرك أسفل النصل حتى يبدأ الشريط فـى الانحناء لأعلى بالقرب من حافة النصل ،

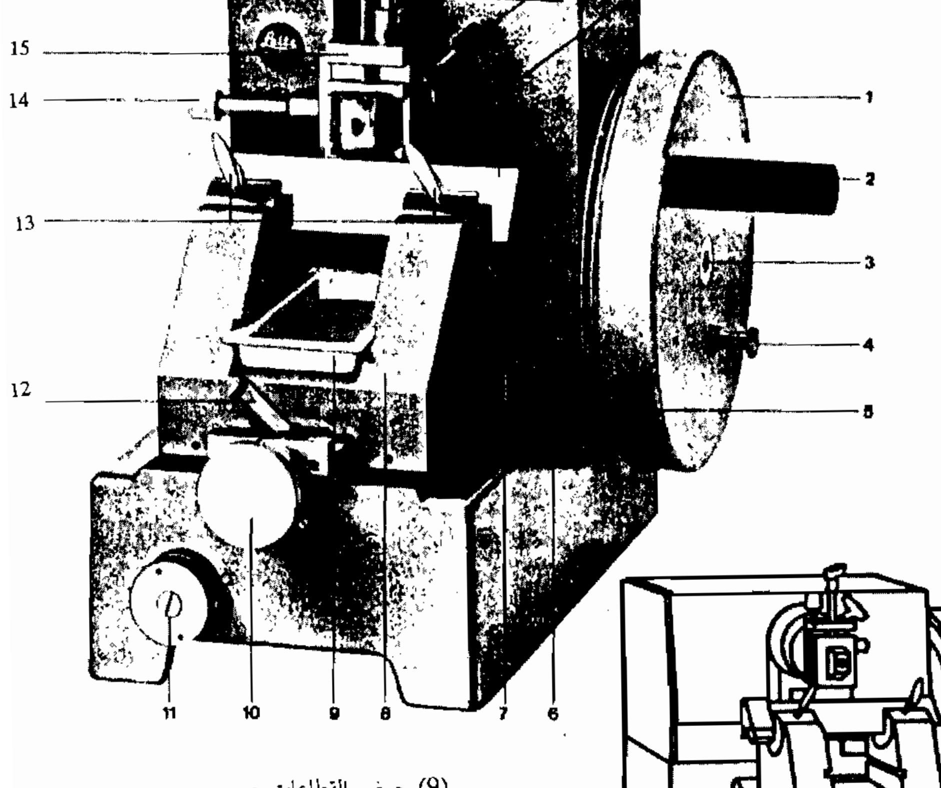
عند هذه النقطة ضع الملقط أو إبرة التشريح أسفل الشريط وهو لا يزال ملامسا لحافة النصل . امسك الشريط لأعلى مع عدم وضع أى ثقل عند مكان ملامسته للنصل ثم افصل الشريط بعد ذلك عند الحافة القاطعة أو أترك قدرًا ضئيلاً من الشريط لدى حافة النصل ؛ حتى يسهل قطع الشريط وهذه العملية تحتاج إلى بعض التدريب ، استمر فى تحريك عجلة اليد بإيقاع منتظم .

(٩) عندما يصل طول الشريط إلى حوالى ٢٠ سم افصله بفرشاة رسم من حافة النصل وذلك بحركة متجهة لأعلى . يجب ملاحظة أن استمرار احتكاك شعر فرشاة الرسم بحافة النصل يؤدى إلى تلف الحافة لذلك يجب أن تمرر الفرشاة بسرعة بعيدا عن الحافة القاطعة للنصل . ضع الشريط المتحصل عليه فى العلبة (من الورق المقوى) الخاصة بحفظ الشرائط .

(١٠) عند الانتهاء من عملية القطع أو ترك الميكروتوم لأى سبب ينزع نصل السكين ويوضع فى الصندوق الخاص به . من المعروف أن معظم حوادث المعامل تكون نتيجة الإهمال فى التعامل مع نصل السكين .

ويصمم الميكروتوم الدوار (شكل ٥ - ١ و ٥ - ٢) بطريقة تسمح مع كل لفة لعجلته أن يندفع القالب الشمعى تجاه حافة السكين بمسافة عدة ميكرونات حسب ما تحدده بواسطة ضابط الميكرونات (ضابط السمك) ، وبذلك فإن السكين مع لف عجلة الميكروتوم تقطع قطاعات شمعية بالسمك المطلوب وذلك من الوجه الأمامى للقالب الشمعى . ومن المفترض أن الحرارة الناشئة عن عملية التقطيع تعمل على التصاق القطاعات الشمعية المتتالية ؛ بحيث تكون الحافة العلوية للقطاع السابق ملتصقة مع الحافة السفلية للقطاع اللاحق ، وبذلك يتكون شريط من القطاعات الشمعية يحتوى كل منها على قطاع من العينة المطمورة داخل القالب الشمعى - وتجمع شرائط الشمع من على السكين بواسطة فرشاة ، وتنقل إلى علبة الحفظ أبعادها ٢٠ × ٤٠ سم وذات ارتفاع ٤سم ، ويراعى تزويد العلبة بالبيانات اللازمة عن العينة ويستحسن وضع فرخ من الورق الأسود فى قاع العلبة لبسط شرائط الشمع عليه . ويراعى وضع شرائط الشمع بالترتيب ؛ بحيث يوضع أول القطاعات فى الركن الأيمن العلوى للعلبة ثم تتوالى الشرائط الشمعية بنظام معلوم ، مع ملاحظة أن يكون السطح غير اللامع لشريط الشمع إلى أعلى والسطح اللامع إلى أسفل ، وإذا ما كان لصق القطاعات





(1) عجلة الإدارة .

(2) ماسك .

(3) مسمار تثبيت .

(4) مسمار التحكم فى حركة العجلة .

(5) مجرى سير الحركة الآلية .

(6) سلك نقل الحركة الآلية .

(7) زاوية الميل .

(8) ماسك السكين .

(9) حوض القطاعات .

(10) التحكم فى حركة ماسك السكين .

(11) ضبط سمك القطاعات .

(12) إحكام ماسك السكين .

(13) ضبط زاوية ميل السكين .

(14) ضبط وضع ماسك العينة رأسيا .

(15) إحكام ماسك العينة .

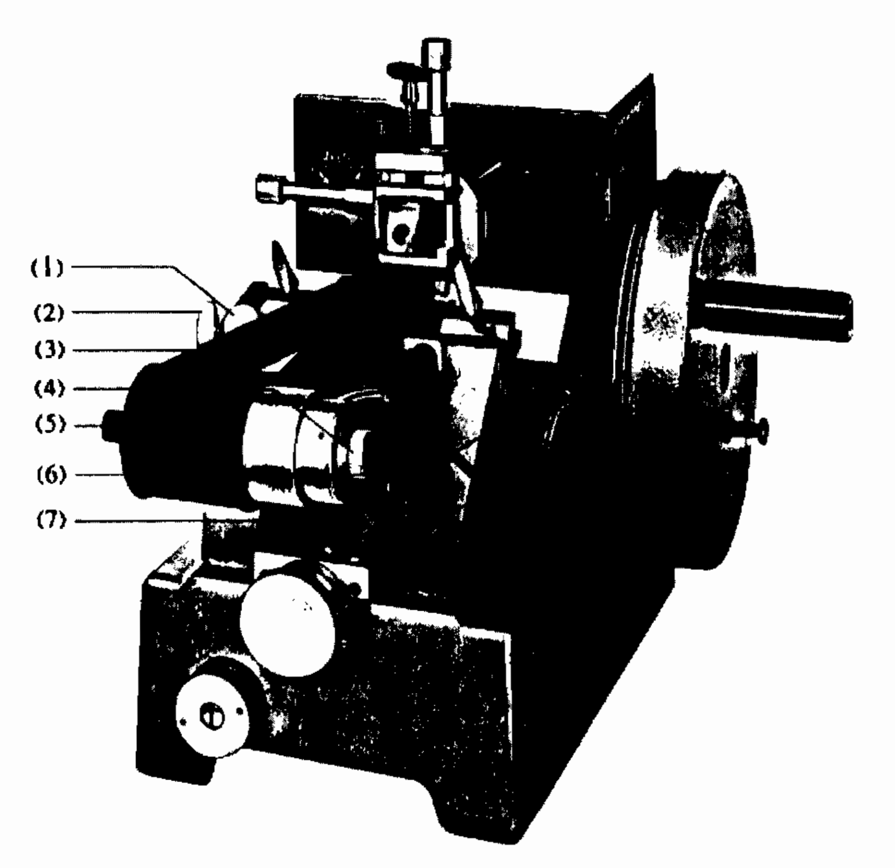
(16) تحميل العينة .

(17) ضبط وضع ماسك العينة أفقيا .

(18) تحريك ماسك العينة إلى الأمام .

(19) السكين .

شكل (٥-١) : الميكروتوم الدوار.



(1) مسمار لربط السير الناقل الأوتوماتيكى بسكين الميكروتوم .

(2) صمولة لتحميل السير الناقل الأوتوماتيكى على قالب السكين.

(3) السير الناقل الأوتوماتيكى .

(4) قطعة مستديرة لتنظيم سرعة السير الناقل .

(5) قطعة مستديرة لإدارة السير الناقل يدويا .

(6) قطعة مستديرة لربط السير الناقل الأوتوماتيكى .

(7) سلك الالتواء للسير الناقل الأوتوماتيكى .

شكل (٥-٢) : ميكروتوم دوار مزود بسير ناقل لشريط الشمع .

الشمعية على الشرائح الزجاجية سوف يجرى فى وقت لاحق تغطى علب شرائط الشمع لحمايتها من الأتربة ، مع حفظها فى مكان بارد حتى لا تلتصق القطاعات الشمعية بالورق الموضوع فى قاع العلبة .

مشكلات عملية القطع بالميكروتوم الدوار والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies

حصر ريتشاردز (Richards) ١٩٥٩ المشاكل المصاحبة لعملية القطع والحلول الممكنة فيما يأتى :

(١) إذا كان الشريط ملتويًا وغير مستقيم Crooked :

(أ) الحافة العليا والسفلى للقالب غير متوازيتين لبعضهما البعض أو لحافة السكينة ، يراعى عمل التسوية اللازمة .

(ب) ربما تكون حافة السكينة غير منتظمة . جرب جزءًا آخر من حافة السكينة أو استبدل السكين بأخرى حادة .

(٢) إذا لم يتكون الشريط لانفصال القطاعات :

(أ) حافة النصل تالمة - اشحذها .

(ب) هناك خطأ فى ميل السكينة . اضبط زاوية الميل .

(جـ) الحافة العليا والسفلى لوجه قالب الشمع مفتتة أو متكسرة Crumbled أو مستديرة Rounded ، فيلزم إعادة تسويتها بشفرة حادة .

(٣) إذا كانت القطاعات الناتجة منضغطة أو ملتفة Compressed or Folded :

(أ) حافة النصل تالمة - اشحذها .

(ب) زاوية السكينة قريبة جدا من الوضع الرأسى . استخدم زاوية أكبر .

(جـ) يعوق الشمع السكين - يراعى تنظيف الحافة بالكلوروفورم .

(د) القطاعات رقيقة جدا ، يلزم زيادة سمك التقطيع .

(هـ) الشمع طرى جدا لأن الحجرة دافئة . يبرد النصل بإمرار مكعبات من الثلج عليه ، أحيانا قد يفيد تمرير مكعب من الثلج فى اتجاه معاكس لوجه قالب الشمع .

(و) قد يوجد بالشمع آثار من الزيلول . يلزم إعادة عملية الطمر .

(٤) إذا كانت العينة مفتتة أو تسقط من شريط الشمع :

(أ) قد يرجع ذلك إلى عدم التجفيف والترويق الجيد للنسيج فيلزم انصهار الشمع وإعادة التجفيف والترويق .

(ب) إذا كانت العينة صلبة جدا ومتماسكة فيجب عمل التطرية اللازمة بنقع قالب الشمع فى الماء أو فى كحول الإيثايل ٧٠٪ .

(جـ) مكثت العينة فى فرن الشمع لمدة طويلة وتحت درجة حرارة عالية ، فى هذه الحالة يجب التخلص منها لعدم صلاحيتها .

(د) العينة صلبة جدا بالنسبة لطريقة الشمع كما هو الحال فى العينات الخشبية مثلا ، فيلزم تجربة طريقة الطمر فى السللويدن .

(٥) إذا كان الشريط ينفصل باستمرار أو يتجزأ رأسياً :

(أ) يرجع ذلك لوجود ذرات من التراب عالقة بحافة السكينة أو على سطح قالب الشمع فيلزم تنظيف حافة السكينة بعناية بالكلوروفورم .

(ب) أو قد يكون الجزء المستخدم من النصل غير حاد ، جرب جزءاً آخر من حافة السكينة أو اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

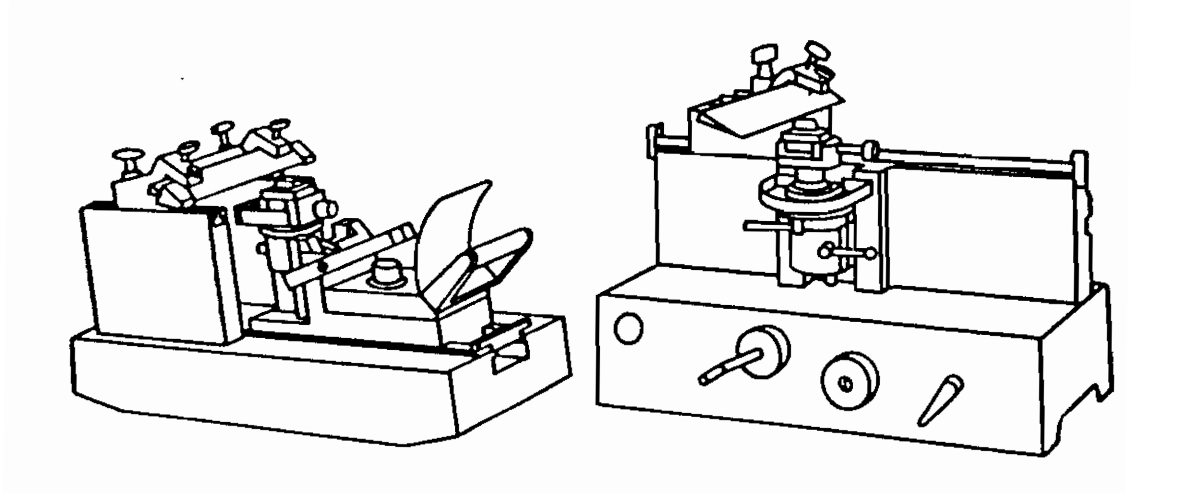
(٦) إذا كان شريط الشمع يلتف حول إصبعك أو حول نصل السكين أو أى شئ آخر ، فإن المشكلة تكمن فى تكهرب الأشرطة والتى غالبا ما توجد فى الحجرات شديدة الجفاف . ولعلاج ذلك ضع إناءً به ماء يغلى باستمرار قريباً منك ، أو قم بعمل القطاعات فى ساعات الصباح أو اعمل أشرطة قصيرة أو قم بتوصيل يد السكين بصنوبر ماء بواسطة سلك .

ثانياً : الميكروتوم المنزلق لقطاعات السللويدن

Sliding microtome for celloidin sections

يستعمل الطمر فى السللويدن فى حالة النماذج الكبيرة أو شديدة الصلابة ، وعلى ذلك فالميكروتوم المستخدم فى قطاعات السللويدن عادة ما يكون كبير الحجم وله قاعدة ثقيلة .

ويعتبر الميكروتوم المنزلق (شكل ٥ - ٣) هو الجهاز الذى يشيع استخدامه فى إعداد قطاعات السللويدن حيث يكون القالب فى هذا النوع ثابتا بينما يتحرك النصل الثقيل بزاوية خلال سطح القالب . ويجب على من يعمل على هذا النوع من الميكروتومات أن يأخذ حذره من النصل المتحرك فقد يتسبب فى حدوث أضرار خطيرة ، ولهذا السبب غالبا ما يزود معمل الميكروتكنيك بميكروتوم دوار متين ذى نصل مثبت فى وضع أفقى وماسك القالب هو الذى يتحرك أفقيا تحت حافة النصل .



انزلاق القاعدة　　　　انزلاق السكين

شكل (٥ - ٣) : الميكروتوم المنزلق

تحفظ قوالب السللويدن فى ٧٠٪ كحول إيثايل ولا يجب أن تتعرض للجفاف ومن المعروف أن كحول الإيثايل المستخدم فى القطع وأثر الانزلاق للأسطح الموجهة للآلة القاطعة يمكن أن يتسبب فى تآكل هذه الأجزاء من الميكروتوم ويتسبب فى تلفه بسرعة ، ولذلك يجب الحرص الشديد والعناية التامة فى تنظيف وتزييت كل الأسطح المنزلقة . ويجب أثناء عملية القطع أن يطفو ماسك السكين على فيلم من الزيت ، وبعد الانتهاء من عملية القطع يجب مسح وتجفيف وإعادة تزييت كل الأسطح .

ويحتاج العمل إلى توفر فرشاة رسم صغيرة لالتقاط القطاعات من على حافة السكينة

وكأس به ٧٠٪ كحول إيثايل وعدد من الأطباق البترى تحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل توضع بها القطاعات .

ويجدر بالإشارة أن الميكروتوم المنزلق يستخدم أيضا فى عمل قطاعات بالعينات الصلبة التى تطمر فى شمع البارافين كما هو الحال فى الجذر أو الساق الذى حدث بهما نموًا ثانوياً ؛ حيث تستقبل القطاعات فرادى فى طبق بترى به ماء دافئ تمهيداً للصقها بعد ذلك على شرائح ، ثم تتبع الخطوات المعتادة بعد ذلك .

الإرشادات الاساسية للميكروتوم المنزلق

Basic directions for the sliding microtome

(١) ضع القاعدة المثبت عليها قالب السللويدن فى ماسك القالب . أترك بضعة ملليمترات من القاعدة معرضة فوق جانبى الماسك ، حتى لا يتسبب الضغط الواقع على الجانبين (فكى الماسك) فى انفصال قالب السللويدن.

(٢) اضبط السطح الأفقى لقالب السللويدن ، ثم اخفض القالب بواسطة آلية التقدم لتقليل ارتفاعه وبذلك يصبح القالب غير معرض للخطر ثم تأكد من ضبط السكين . دائما ضع القالب أولاً قبل وضع السكين فى ماسك السكينة . ويجب أن يظل قالب السللويدن مبللاً بـ ٧٠٪ كحول إيثايل بواسطة فرشاة الرسم .

(٣) ادفع ماسك السكينة للخلف بحيث تصبح السكينة بعيدة عن القالب . بعد تثبيت السكينة جيدا فى الماسك اضبطها رأسيا على زاوية مقدارها ١٥° . أما الزاوية الأفقية للسكينة فتعتمد بدرجة كبيرة على العينة فمثلا بالنسبة لقطاعات الأفرع ابدأ بزاوية ٣٠° أو ٤٠° بين حافة السكينة واتجاه حركة ماسك السكينة (يجب على كل شخص أن يكتشف بنفسه أفضل طريقة للضبط بالنسبة له وهذه تتأتى بالمران والخبرة) . وبما أن وضع السكين يكون بزاوية أفقية بالنسبة لقالب السللويدن فإنها سوف تصطدم بركن القالب قبل أن تقطع العينة إلى شرائح ، والسكين هو الجزء المتحرك فى عملية القطع بالميكروتوم المنزلق لذلك يجب أخذ الحذر الشديد لتجنب انزلاق أو تلف القالب أو حدوث ضرر لأصبعك .

(٤) اجذب السكينة مباشرة فى مواجهة القالب ، واضبط سطح القالب بحيث يكون أفقيا

وموازيا لحافة النصل ، وبـالتقدم اليدوى أرفع سطح القالب حتى يـتلامس فيلم كحول الإيثايل الموجود على سطح القالب مع حافة السكين .

(٥) اضبط التدريج على ٣٠ ميكرون . حرك السكينـة للخلف ولأعلى بحركة ثابتة ، وبعد كل حركة للسكين يبلل سطح القالب وحافة السكينة بـ ٧٠٪ كحول إيثايل .

(٦) بعد أن تعـمل السكينة قطـاعًا كاملاً بسمك ٣٠ ميكـرون ، اضبط آلية التقدم لـلسمك المطلوب .

(٧) يجب أن يرفع كل قطاع من على حافة السكيـنة بواسطة فرشاة رسم ، ثم ينقل مباشرة إلى طبق بترى يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل . ويجب أن يبلل سطح القالب وحافة السكينة بالكحول قبل عمل القطاع التالى .

(٨) فـــى حالة الـرغبة فى حـفظ القـطاعات مرتـبة ، يوضـع كل قطاع فـى طبق ستـندر (Stender dish) على قرص من الورق يمكن ترقيمه .

(٩) بعد الانتهاء من عملية القطع ، انزع السكين وجففها بحرص ، ثم ضع قالب السللويدن فى وعاء يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل ، ثم امسح الميكـروتوم بعناية ، وأعد تزييت كل الأسطح .

(١٠) تصبغ القطاعات على حـدة قبل تحميلها على الشريحة والصبغة المـستعملة فى قطاعات السللويدن ، هى Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

مشكلات عملية القطع بالميكروتوم المنزلق والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

(١) إذا كانت القطاعات بها خدوش أو تنفصل عن السللويدن :

(أ) السكينة تالفة - حرك حافة السكينة أو اشحذها .

(ب) توجد جزيئات مـن التراب فى قالب السللويـدن - رشح محلول Parlodion قبل استعماله ثانية .

(٢) إذا كانت القطاعات تسقط من قالب السللويدن :

(أ) قد يرجع ذلك إلى عدم كفاية التجفيف والتشريب - أذب السللويدن وأعد الخطوات من جديد .

(ب) السللويدن طرى جدا - حاول تجميده فى الكلوروفورم .

(٣) إذا كانت القطاعات غير منتظمة السمك :

(أ) مازال أحد ضوابط الميكروتوم غير مثبت جيدا - أعد ربط كل المسامير واختبر ثبات قالب السللويدن على قاعدته .

(ب) يتحرك ماسك السكينة حركة غير منتظمة - حرك السكينة بانتظام ، اترك السكينة تقوم بعملية القطع .

(جـ) زاوية ميل السكين ضعيفة جدا - استخدم زاوية أكبر .

(د) قالب السللويدن جاف - انقعه فى ٧٠٪ كحول إيثايل ، واحرص على أن يظل مبللاً دائمًا عند إجراء عملية القطع .

(هـ) السكينة تالفة - جرب جزءًا آخر من حافة النصل أو اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

ثالثا: ميكروتومات القطاعات المثلجة (المبردة)

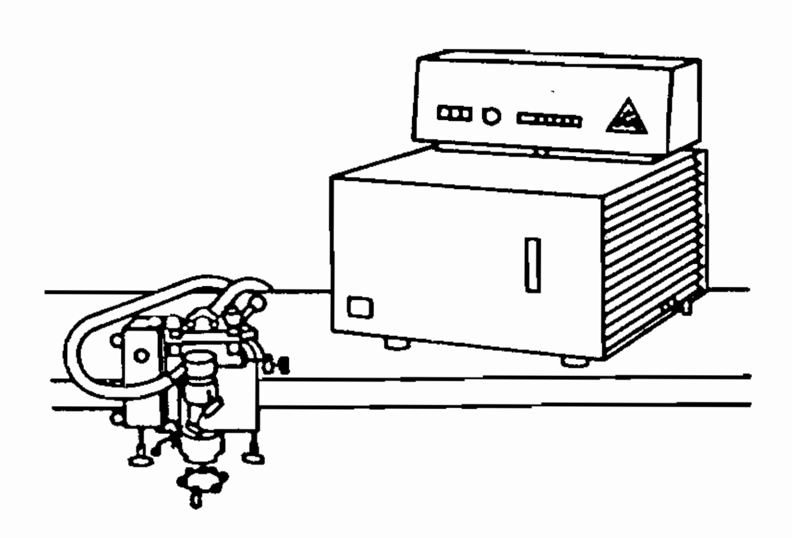
Microtomes for frozen sections

(أ) الميكروتوم الثلجى Freezing microtome

الميكروتوم الثلجى الإكلينيكى Clinical Freezing Microtome ميكروتوم بسيط (شكل ٥ - ٤) ، يمكن تثبيته على مائدة ومزود بجهاز للتبريد بغاز ثانى أكسيد الكربون CO_2 . وهو أساسا ميكروتوم منزلق وفيه يتحرك النصل بشكل حلقة أو قوس عبر النسيج المبرد الموجود على مائدة التبريد الثابتة ، ويتم تشغيله أوتوماتيكيا أو يدويا ، وترفع مائدة التبريد بعد كل دورة للسكينة . من المعروف أن الميكروتومات المنزلقة الخاصة بالسللويدن يمكن تزويدها أيضا بأجهزة تبريد وتعتبر ميكروتومات ثلجية ممتازة . وجهاز التبريد عادة عبارة عن غرفة معدنية مجوفة تتصل بأسطوانة بها غاز ثانى أكسيد الكربون حيث يتم التبريد بإطلاق الغاز على هيئة دفعات قصيرة داخل الغرفة ، ويُبرد تمدد الغاز الغرفة بسرعة ويجمد

العينة الموضـوعة علـى مائد التبريد . ويوجد الآن عديد من موائد التبريد الكهربى الحرارى (التى تعتمد على تأثير Peltier) ، يمكـن التحكم فى كل من الـتبريد والتسخين بسهولة تامة . وتتلاءم هذه الموائد بسهولة شديدة مع أى من الميكروتومات المنزلقة .

ويتطلب العمل وجـود فرشاة رسم صغيرة ، وعدد مـن الملاقط ، وزجاجة تنقيط للماء المقطر .



شكل (٥ - ٤) : الميكروتوم الثلجى مزود بجهاز تبريد.

الإرشادات الأساسية للميكروتوم الثلجى الإكلينيكى

Basic directions for clinical freezing microtome

(١) افحص الميكروتوم لتـتأكد من تزييته جيداً وأن كل المسامير مـحكمة وأن الأجزاء تتحرك بحرية وأن صمام أسطوانة غاز ثانى أكسيد الكربون يُفتح ويُغلق بسهولة.

(٢) ضع ورقة ترشيح مربعة صغيرة (أكبر قليلا من القالب) على قمة مائدة التبريد وشبعها بقطرة ماء .

(٣) ضـع العينة المطـمورة فى قالب الجيلاتين علـى ورقـة الترشـيح وأضف نقطة أخرى من الماء . ويجـب أن يُكوّن الماء دعامة عـند قاعدة القالـب ، ولكن يجب ألا يـزيد حول

أجزاء القالب حتى يسهل القطع ؛ حيث أن الثلج الناتج عن زيادة كمية الماء سوف يصطدم بالسكينة ويتسبب فى قطاعات غير منتظمة .

(٤) اضبط ارتفاع القالب حتى يصبح أسفل مستوى السكينة بمقدار $\frac{١}{٢}$ سم أطلق غاز CO_2 على هيئة دفعات قصيرة حتى يتم تبريد العينة . امسك القالب الموجود على مائدة التبريد بواسطة ملقط لأسفل حتى تبدأ القاعدة فى التجمد .

(٥) عند تجمد القالب اضبط السكين فوق القالب فينحرف الغاز فوق قمة القالب وتتم عملية التجمد بسرعة . ويؤدى هذا أيضا إلى تبريد السكين .

(٦) عند التشغيل ارفع القالب ، وعندئذ يمكن للسكينة أن تعمل قطاعات بسمك ١٥ ميكرون . وتحدد الخبرة درجة الحرارة المثلى للقطع ، وسوف تتفتت القطاعات إذا كان القالب باردًا جدا أو تذوب داخل المادة اللزجة إذا كان القالب طريًا جدا . وتتطلب طريقة العمل التبريد المتوالى للقالب بدفعات الغاز وسرعة القطع لعدد من القطاعات عندما يكون القالب معرضًا لدرجة الحرارة المطلوبة .

(٧) ارفع القطاعات من على حافة السكينة بفرشاة رسم صغيرة ، أو بواسطة طرف إصبعك الصغير ، ثم ضع القطاعات فى طبق به ماء مقطر .

(٨) يمكن التعامل مع قطاعات الأنسجة المطمورة فى الجيلاتين بسهولة بواسطة ساق زجاجية صغيرة ملتوية على شكل عصا الجولف . وتصبغ القطاعات بواسطة صبغة Sudan Black B وتحمَّل فى غروى الجلسرين .

مشكلات القطع بالميكروتوم الثلجى والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

(١) إذا كانت القطاعات مفتتة :

(أ) القالب لم يتم تجميده كما يجب - إسرع وقت التجميد عن طريق إطلاق الغاز فى دفعات أطول .

(ب) السكينة تالمة - اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

(جـ) السكينة دافئة - بردها ، غلّف السكينة بثلج جاف بواسطة شريط شفاف (مصنوع من السليلوز) .

(٢) إذا كانت القطاعات متباينة السمك :

(أ) السكينة تالفة - اشحذها .

(ب) بعض مسامير الميكروتوم أو الضوابط مفكوكة - اربط كل مسامير الضبط .

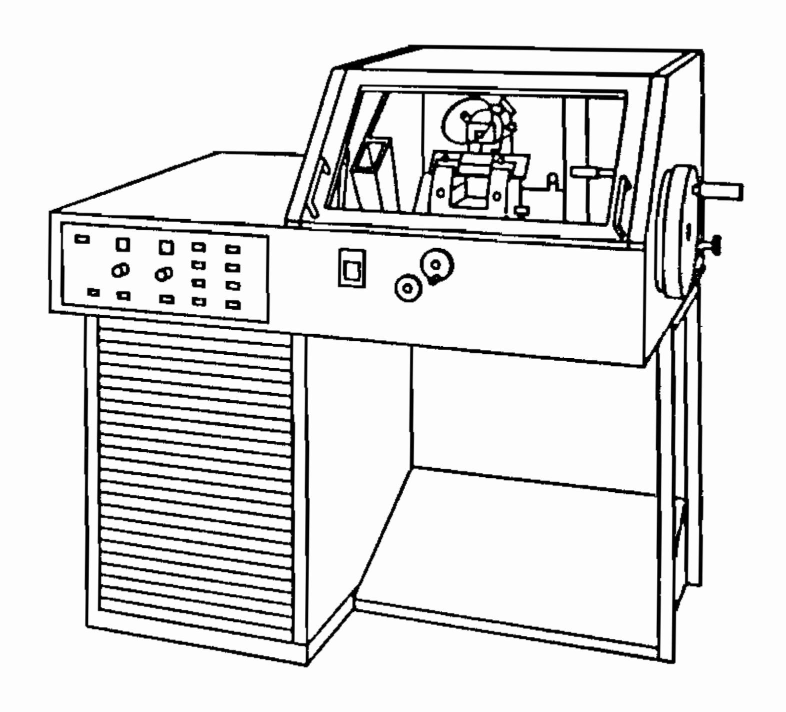
(جـ) قد يكون الميكروتوم به عيوب فيجب إصلاحه (صيانة الميكروتوم هامة جدا) .

(د) ينفصل القالب عن مائدة التبريد - أذبه ثم أعد تجميده .

(ب) ميكروتوم الكريوستات Cryostat microtome

يصمم الكريوستات (شكل ٥ -٥) لعمل قطاعات سريعة رقيقة ومفككة لاستخدامها في دراسات كيمياء الأنسجة ولفحص الأنسجة المستأصلة أثناء العمليات الجراحية . وهو أساساً ميكروتوم دوار موضوع داخل حجرة مبردة ، حيث يمكن من خلاله ضبط درجات الحرارة المثلى لعدد كبير من الأنسجة . تعتمد القطاعات الجيدة على مدى حدة السكينة وسرعة تجمد الأنسجة على درجة الحرارة المثلى . يلاحظ أن عديدًا من الأنسجة سوف يتمزق أثناء عملية القطع إلا إذا كانت مدعمة بقالب ، ويمكن طمر الأنسجة في الجيلاتين أو يتم إحاطتها بالصمغ العربي أثناء عملية التجميد . وللحصول على أفضل النتائج اطمر النسيج بالكامل في مركب OCT (Lab - Tec, Westmont, Illinois) أثناء التجميد ، ويجب أن تكون عملية التجميد سريعة جدا لتجنب تكوين بللورات كبيرة من الثلج . يجب أن تستكمل مراحل التجميد السريع للكريوستات المتاح تجاريا باستعمال رقائق من الثلج الجاف أو دفعات قصيرة لغاز ثاني أكسيد الكربون أو غاز الفريون الناتج من عبوة الضغط .

ويحتاج العمل لوجود فرشاة رسم وزوجين من الملاقط (أحدهم يوضع في غرفة التبريد) ونظراً لأن خطوات الصبغ سريعة جدا فيجب أن تُعد محاليل الصبغ مقدما في أطباق كولومبيا Columbia dishes وذلك للأغطية أو في أواني الصبغ Coplin jars وذلك للشرائح .



شكل (٥ - ٥) : ميكروتوم الكريوستات.

الإرشادات الأساسية للميكروتوم الكريوستات

Basic directions for cryostat microtome

(١) تثبت درجة الحرارة فى غرفة التبريد عند ٢٠° م . توضع مواسك العينة والملاقط الإضافية وصندوق السكين والنصل بداخل غرفة التبريد لتبريدهم .

(٢) تثبت الأنسجة المفككة مباشرة على مواسك العينة . يرفع ماسك العينة ويسخن سطحه المعاكس لاتجاه يدك ، ويجب أن تكون يديك جافة حتى لا تلتصق بالمعدات الباردة . ضع طبقة رقيقة من مركب OCT عند درجة الحرارة المناسبة على سطح النسيج ثم اطمر النسيج فى مركب لزج ، أضف المزيد من المركب حتى يصبح النسيج مُغطى . يبرد الماسك بطريقة التجميد السريع فيتجمد النسيج بسرعة وانتظام ، أو باستخدام دفعات قصيرة ناتجة عن عبوة ضغط الفريون ، وذلك بتعريضها فوق قمة النسيج .

(٣) ضع السكينة المبردة فى ماسك السكينة ثم اضبط الزاوية على ١٠° . يمكن الحصول على القطاعات الأرفع من ١٠ ميكرون إذا كانت قطع الثلج الجاف مثبتة على السكينة لتبريدها .

(٤) اضبط زاوية سطح ماسك العينة وهى أصغر من تلك المستخدمة فى ميكروتوم البارافين. تأكد من أن السطح موازيا للسكينة فلا يرتطم الماسك المعدنى بحافة السكينة ويكسرها. إذا وجد جهاز مضاد للالتفاف Antiroll يجب ضبطه بحرص ، أما إذا لم يكن موجوداً فإن كل قطاع يجب توجيهه بفرشاة رسم لمنع تجعده .

(٥) ادفع عجلة الحركة بشدة أثناء الدوران لأسفل On the downstroke .

(٦) انقل كل قطاع برفعه بجهاز مضاد الالتفاف Antiroll ، ثم المس القطاع بالسطح المستوى لغطاء الشريحة ، يذوب الثلج ويلتصق القطاع فى الحال بغطاء الشريحة ويمكن وضعه فى مثبت . بعض الأنسجة مثل العضلات والتى لا تلتصق بسهولة بغطاء الشريحة يجب تجفيفها لمدة ٣٠ ثانية عند درجة حرارة الغرفة قبل تثبيتها .

(٧) يمكن استعمال طريقة صبغ Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

مشكلات القطع بميكروتوم الكريوستات والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies

(١) إذا كانت القطاعات تنهار أو تسقط Collapse من على حافة النصل :

(أ) النسيج أو السكينة أو الاثنين معا لم يتم تبريدها كما يجب - انتظر حتى يتم تبريدهما فى غرفة التبريد المغلقة .

(ب) السكينة تالمة - اشحذها .

(٢) إذا كانت القطاعات مفتتة :

القطاعات باردة جدا - أعد ضبط درجة حرارة غرفة التبريد .

(٣) إذا كانت القطاعات ممزقة أو متباينة السمك :

(أ) السكينة تالمة - اشحذها .

(ب) الميكروتوم مستهلك - يجب عمل الصيانة اللازمة لإصلاحه .

(جـ) السكينة غير نظيفة - نظفها .

(د) النسيج غير مبرد جيدا - أفحص الثرموستات .

رابعاً : الميكروتوم الفائق لقطاعات المجهر الإلكترونى

Ultra microtome for electron microscope sections

اعتمدت الدراسات الخاصة بالمجهر الإلكترونى فى الأربعينات من القرن العشرين على الاستفادة من المناطق الرقيقة التى توجد على أطراف القطاعات المستدقة ذات الشكل الوتدى باستخدام الميكروتوم القياسى ، لكن غالبا ما كان القطاع سميكا بدرجة لا تسمح باختراق الإلكترونات بالقدر الكافى ، كما أن الأطراف الرقيقة كانت صغيرة المساحة ولا تكفى للحصول على معلومات وافية .

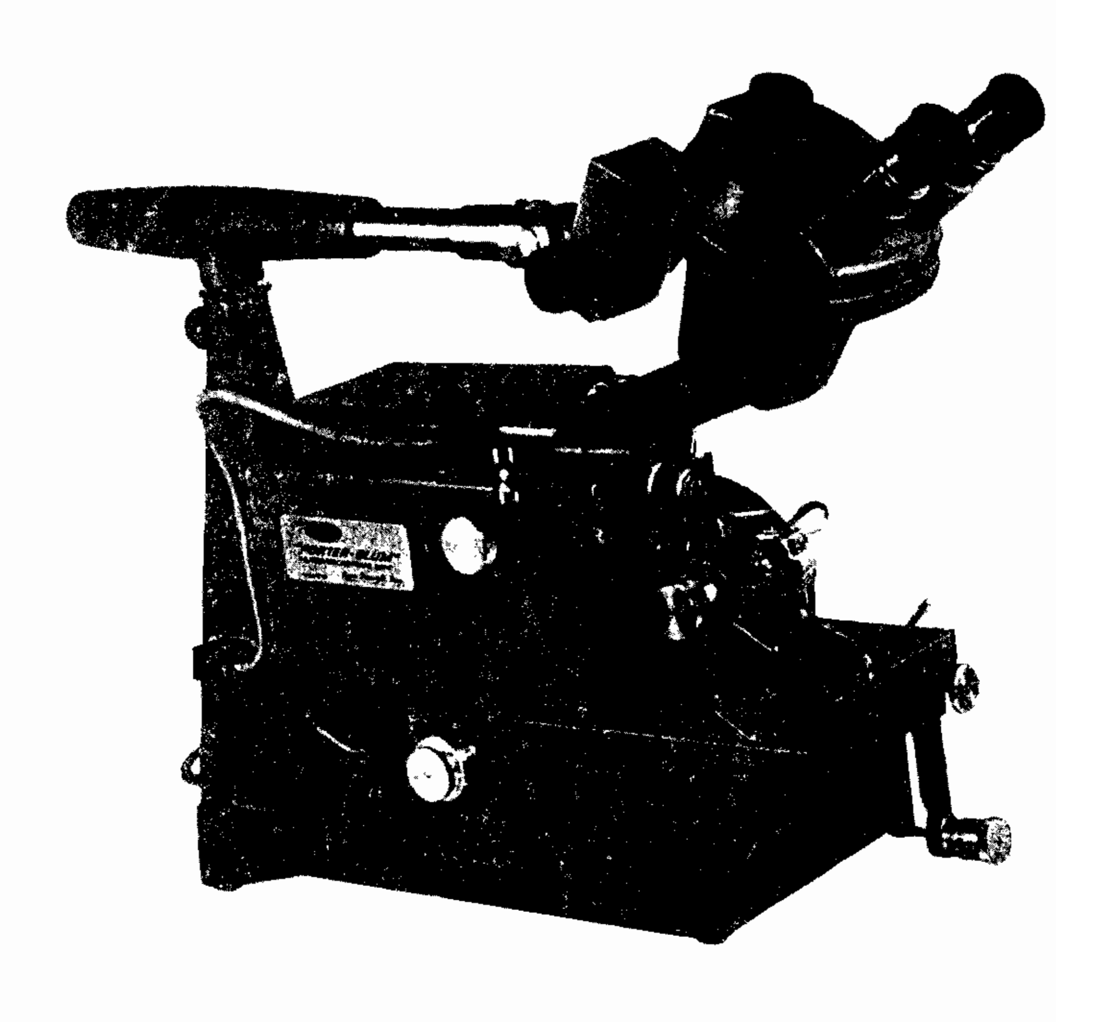
كانت المحاولات الأولى لإنتاج قطاعات كاملة رقيقة تناسب المجهر الإلكترونى بتصميم الميكروتوم الزائد السرعة ، والذى قد تصل عدد القطاعات الناتجة عنه إلى أكثر من ٤٠٠٠٠ قطاع فى الدقيقة الواحدة ، لكن المشكلات التى صاحبته لم تشجع على استمرار العمل به .

ولقد كان الافتقار إلى بيئة تحميل مناسبة من أهم العوائق التى صاحبت تجهيز العينات فيما مضى ، فلم يكن شمع البارافين صلباً بدرجة تناسب التحضيرات المطلوبة للفحص بالمجهر الإلكترونى .

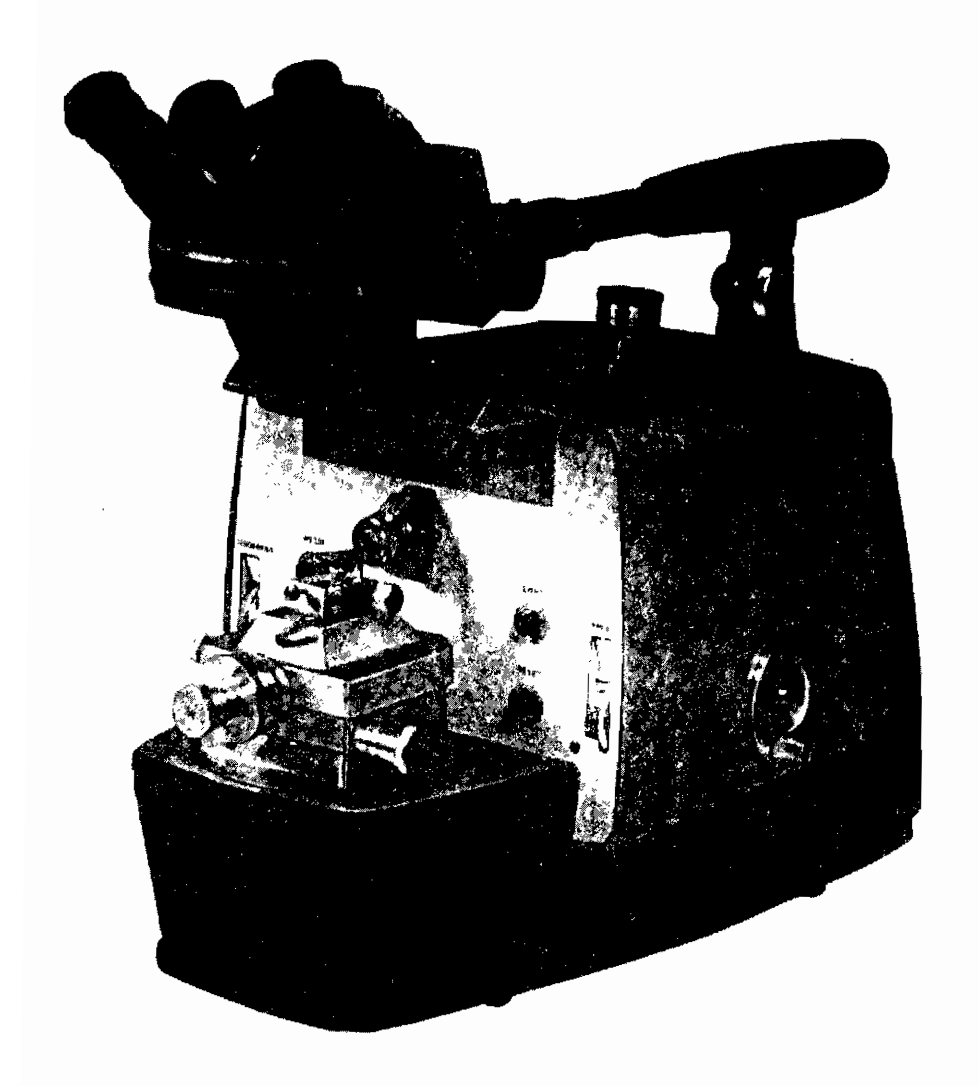
حاول البعض فى بداية الأمر تصميم ميكروتوم توضع العينة به على حامل على هيئة قرص يتحرك دائريا للتغلب على مشكلة احتكاك العينة بالسكين فى رحلة العودة ، ولقد قدمت المصانع عديداً من أشكال الميكروتومات ، منها على سبيل المثال طراز يعطى فى ذات الشريط قطاعات ذات سمك يناسب الفحص بالمجهر الإلكترونى ، وأخرى تناسب الفحص بالمجهر الضوئى ، وذلك يتيح الفرصة لإجراء مقارنة للقطاعات المتجاورة باستخدام كل من المجهر الإلكترونى والضوئى .

ولقد استخدمت السكين الزجاجية عام ١٩٥٠ بدلا عن السكين المعدنية ذات حافة النصل الحادة ، وحل محلها بعد ذلك السكين الماسية .

يوضح كل من الشكل (٥ - ٦) و الشكل (٥ - ٧) الميكروتومات الفائقة طرازى MT-1 و MT - 2 وهى تعتبر أجهزة قطع متقدمة تمكن الشخص ذا الخبرة القليلة نسبيا من عمل قطاعات لكل من المجهر الضوئى والإلكترونى . ومن مميزات هذه الميكروتومات أن المجرى الجانبى للسكين يكون أثناء حركة القطع مجهزاً لعمل قطاعات سميكة ورقيقة بالتبادل دون إيقاف لخطوات القطع أو إعادة ضبط التدريج .



شكل (٥ - ٦) : الميكروتوم الفائق طراز MT-1 مزود بمجهر مزدوج العدسات ومصدر إضاءة.

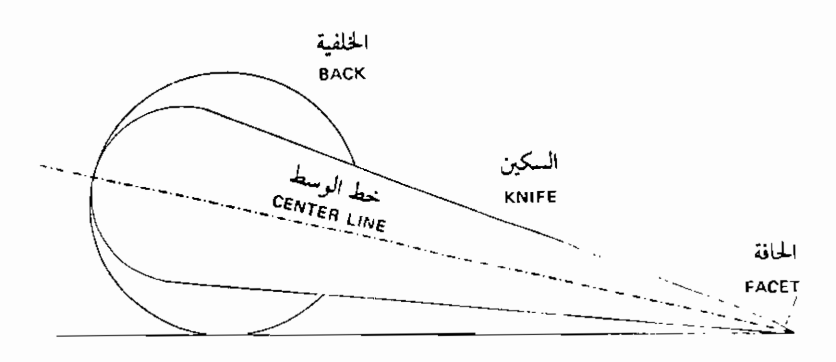


شكل (٥ - ٧) : الميكروتوم الفائق طراز MT-2 مزود بمجهر مزدوج العدسات ومصدر إضاءة.

سكين الميكروتوم Microtome knife

تصنع سكين الميكروتوم من صـلب على درجة عالية من الجودة لين Soft بالدرجة التى تسمح بسنه إلى حافة حادة جدا ، وصلد Hard بالدرجة التى تحافظ على حدة الحافة خلال احتكاكها بشمع البارافين وما به من أنسجة مطمورة . لا تصنع سكين الميكروتوم من الصلب غير القابل للصدأ لذلك يجب العنـاية بها حتى نتحاشى حدوث أى صدأ . فإذا ما صدأت حافة السكين تكونت بها نقر وتصبح عديمة الفائدة . وبطبيعة الحالة فإن السكين المستعملة مع الميكروتوم الثلجى تكون أكثر عرضة للتلف نتيجة للصدأ .

عادة ما تزود سكين الميكـروتوم بخلفية Back على هيئة أنبوبة مـن الصلب تنزلق على الجهة الخلفية من السكين حيث تتحكم فى زاوية ميل السكين المطلوبة عند وضعها على حجر السن .



شكل (٥ - ٨) : شـكل تخطيطى لقطاع عـــــرضى بسكين الميكروتوم
(ويلى willey ١٩٧١).

تحدد زاوية ميـل السكين أثناء الـسن الزاوية بين سطـحى الحافة Facet وبالتالى نوعية القطع - تزود كل سكين تسن يدويا بخلفية خـاصة بها - ولا تتطلب السكين التى تسن آليا أى خلفية حيث تكـون زاوية ميل السكين ثابتة بجهاز السن - ولا يجـوز فى المرات المتتالية سن ذات السكـين بالأسلوبين لاختـلاف زاوية الميل فى كل منـهما ، لذلك يثـبت سن كل سكين إما يـدويا أو آليا . لا تختبـر حدة السـكين بقطـع شعرة أو خيط ، وإلا تعاد عـملية السن مرة أخرى .

يمكن للمبتدئ الاستعاضة عن السكين بشفرة حلاقة مثبتة بماسك خاص وتبدل الشفرة بغيرها عندما تصير الحافة غير حادة Dull أو منقرة Nicked وتفضل الشفرات السميكة نوعا ما للحصول على نتائج أفضل .

تفحص حافة السكين بالمجهر الضوئى - ضع السكين على حامل خشبى بحيث تكون مائلة بزاوية قدرها ٢٠° على أن تكون الحافة إلى أعلى - ضع السكين على مائدة المجهروافحص الحافة بالعدسة الشيئية قوة ١٠ واحترس أن تلامس العدسة حافة السكين - استخدم ضوءاً ساقطًا ، ترى حافة السكين الحادة على هيئة خط دقيق ومستقيم من ضوء منعكس . تعكس السكين غير الحادة ضوءًا أكثر وتكون الحافة منشارية الشكل يتخللها النقر .

يراعى عند إتمام عملية القطع بالميكروتوم نزع السكين (أو الشفرة) وتجفيفها جيداً - والسن إن لزم الأمر - تطلى السكين بطبقة شحم أو فازلين لحمايتها من الرطوبة أثناء الحفظ حتى لا تصدأ - كما يراعى أيضا نظافة الميكروتوم ووضع غطاء عليه حتى لا يتعرض للأتربة .

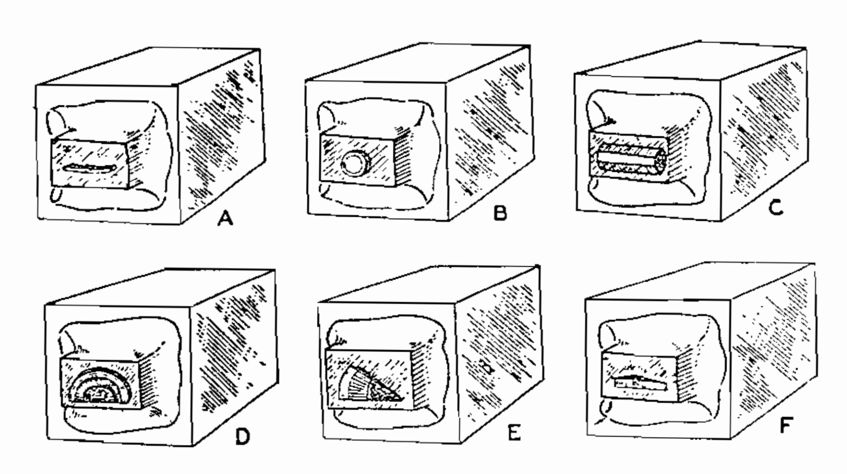
٦ . قطع العينات

Sectioning

قطع العينات النباتية المطمورة فى شمع البارافين

تجهيز القوالب للقطع بالميكروتوم :

(١) يؤخذ من قالب الشمع المحتـوى على العينات النباتية قطعة صغيرة مـنتظمة قائمة الزوايا تحتوى على إحدى العيـنات، مع مراعاة وضع العينة بالنسبة لاتجـاه حركة السكين حتى يتحقق الـهدف المطلوب - ويوضح شكـل (٦ - ١) نماذج لاوضاع العينة أثنـاء عملية القطع . ويجب أن يكون السطح المعد للقـطع مربعاً أو مستطيلا متوازى الأضلاع قائم الزوايا حتـى تحصل على شريـط منتظم ومسـتقيم ، ويجب أن يـتم التقطيـع بواسطة مشرط ، سلاحه مستقيـم ، والأفضل استعمال شفرات الحلاقة ، وتتم عمـلية التقطيع لقالب الشمع بطريقة السحب، وليس عن طريق الضغط حتى لا يتكسر قالب الشمع.



شكل (٦ - ١) : أوضاع العينات مختلفة الأشكال أثناء القطع بالميكروتوم.

A - تحميل ورقة لعمل قطاعات عرضية .

B - تحميل ساق صغيرة لعمل قطاعات عرضية .

C - تحميل ساق صغيرة لعمل قطاعات طولية .

D ، E - تحميل جزء من ساق لعمل قطاعات عرضية .

F - تحميل جزء من ساق عشبى كبير لعمل قطاعات قطرية (شعاعية) .

(ساس Sass ١٩٦١)

(٢) يترك إطار مناسب من الشمع حول النموذج (حوالى ٣ مم) ، عند تنظيم الشمع ويستحسن ترك مسافة أكبر جهة القاعدة ؛ حتى يكون هناك مجال لتحميل القطعة على حامل الميكروتوم وبذلك يمكن قطع العينة حتى نهايتها بسهولة وانتظام .

(٣) تلصق القطعة المحتوية على العينة بعد تجهيزها بتسوية سطوحها على حامل الميكروتوم المعدنى أو الخشبى أو المصنوع من البلاستيك ويتم ذلك بإذابة بعض قشور من الشمع بمشرط ساخن على سطح الحامل ، ثم تغرس القطعة فى وسط هذا الشمع المنصهر ثم تترك لتبرد فيتجمد الشمع وتلتصق القطعة بالحامل . يضاف مزيد من الشمع المنصهر حول الجزء القاعدى من القطعة لعمل دعامة لها وتأكيد تثبيتها على حامل الميكروتوم .

(٤) تنظم القطعة المحتوية على العينة بحيث تكون فى الوضع المناسب على حامل الميكروتوم ؛ تبعا للغرض من القطع إذا كان طوليا أو عرضيا .

(٥) يغمس الحامل فى ماء بارد حتى يتصلب الشمع ، ثم يوضع الحامل فى موضعه من الميكروتوم الذى يكون قد تم إعداده للعمل ، ويكون السطح المعد للقطع موازيا لحافة السكين عند وضع الحامل فى مكانه من الميكروتوم ، وبذا يمكن البدء فى عملية القطع بتحريك يد الميكروتوم أو إدارتها حسب نوع الميكروتوم المستعمل ، وذلك بعد تنظيم سمك القطاعات بواسطة الدليل الخاص الموجود بالميكروتوم ، ويكون القطع بسمك ٥ - ٢٠ ميكرون حسب النموذج { الميكرون (u) = ١ / ١٠٠٠ مم } .

(٦) تقطع العينة النباتية بهذه الطريقة فى قطاعات متسلسلة متصلة ببعضها فى شريط طويل ، يمكن فصل الشريط عن سكين القطع بفرشة صغيرة ، كلما وصل الشريط إلى الطول المناسب (نحو ٢٠ سم) . تحفظ الأشرطة منبسطة فى علب من الكرتون المبطن بورق أسود مصقول ، مع مراعاة تسلسل القطاعات .

(٧) هذه الأشرطة رقيقة جداً فيجب الاحتراس عند التعامل معها ، حتى لا تتمزق أو تلتوى على بعضها البعض فتتلف ، كما يجب عدم تعرضها للهواء أو النفخ حتى لا تتطاير تمهيداً لوضعها بعد ذلك على الشرائح .

العوامل التى تؤثر على عملية القطع Factors influencing sectioning

يتوقف نجاح عملية القطع بالميكروتوم على عدة عوامل متفاعلة مع بعضها البعض ، ومن أهم هذه العوامل مايلى :

(١) نوعية الشمع المستخدم Quality of the paraffin wax

يراعى أن تـكون صلابة الشمـع متناسبـة مع طبيعة أنـسجة العيـنة النباتيـة ، وسمك القطاعات المطلـوبة ودرجة حرارة الغرفة ، ويجب أن يكون الشمع ذا قـوام حبيبى دقيق جدا وخالٍ من الفقاعات والشوائب والبقع المعتمة .

(٢) التشريب النموذجى بالشمع Proper infiltration

يؤدى عدم التشريب النـموذجى بالشمع إلى انفصال العينة عـن الشمع وإذا ما فحصت العينة بـالعدسة ترى الأنسجة مفتـتة ؛ نتيجة عدم كفايـة التخلل أثناء عمليـة التشريب بالشمع ، أو نـتيجة زيادة تصلبُ الأنـسجة مما يجعلهـا هشة بطبيعتـها ، وقد يلاحظ انفصال القطاعات بعد القطع بعيدا عن الـشمع المحيط بها ، نتيجة عدم اتصال السطوح الخارجية للعينة بـصورة جيدة من الشمع المحيط بها ، وقد ينتج عـدم التشريب الكافى بالشمع عن عدم تمام التجفيف أو السرعة فى إجراء عملية التشريب بالشمع .

(٣) توجيه العينة النباتية المحملة Orientation of the mounted material

يراعى أن تكـون العينة النـباتية فى منتـصف الشمع عند الـقطع ، وإلا فتكون الـطبقة السميكة مـن الشمع إلى أعلى لمقاومة الـضغط الناجم عن عمليـة القطع ، ويراعى ألا تكون طبقة الـشمع المحيطة بالعينة كبـيرة ؛ حتى تكون القطاعات متقـاربة ، وبالتالى يمكن الانتفاع بـأكبر مساحة من الشريحة عـند التحميل وفى ذلك توفيـر لعدد الشرائح والأغطية والشمع ، وكذلك الاقتصار فى استعمال الكيماويات المذيبة للشمع . ويراعى أن يكون سطح العينة موازيا لحافة السكينة ، ويكون وضع السكينة على زاوية قائمة مع اتجاه حركة حامل الـنموذج (إلا إذا كان المطلوب عمل قطاعـات باتجاه خاص) ، كما يراعى زاوية الميل بين سطح السكينة المسطح وسطح العينة ، وتعرف بالتجربة .

(٤) ثبات التحميل Rigidity of mounting

يراعـى أن يكون الحامل المثبت عليه العـينة النباتـية مثبتاً فـى مكانه بالميـكروتوم ، لايتحرك ، وأن تـكون العينة مـلتصقة ومثـبتة تمامًا بالحامـل ، أن يحكم القفـل على السكينة حتى لاتتحرك أو تهتز أثنـاء التقطيع ، إذ إن أى حركة بأى من هذه المواضيع ينشأ عنها قطاعات غير متماثلة السمك ، وهذا يمكن اكتشافه فى الشريط ، ولكنه يكون أكثر وضوحاً بعد الصبغ حيث تكون القطاعات السميكة أغمق لونا من الرقيقة .

(٥) الظروف الحرارية Temperature factors

تتأثر عملـية التقطيع بدرجة حرارة الغرفـة والعينة النباتية والسـكين ، فإذا كانت درجة حرارة إحدى هذه الأشياء مرتفعة عن اللازم . . فإن القطاعات تنضغط وتتجمع فتتعجن على حافة الـسكين مكونة كتلة غيـر متميزة . وعلى العكس مـن ذلك إذا كانت درجة الحرارة لإحـدى هذه الأشياء أقـل من اللازم فإن القـطاعات تلـتوى أو لا تلتـحم مع بعضها ، وبـذلك لا يتكون الشريط المطـلوب . ومن الملاحظ أن القطاعات الـسميكة تتحمل درجات الحرارة العالية عن القطاعات الرقيقة .

(٦) صلابة العينات النباتية Hardness or brittleness of the materials

إذا اتبعت كل الاحتيـاطات السابقة ، ولـم يمكن الحصول على قـطاعات وشرائط جيدة فقد يرجع ذلك إلى صلابة العينات ، ويمكن التغلب على ذلك بتطريتها وذلك بتسوية جهة العينة الموازية لـلسكين بحيث تتعرض الأنسجة ثم يوضع الحامـل بما عليه من عينة نباتية فـى ماء فاتر ، وتؤدى هذه المعـاملة إلى تطرية العـينة مما يسمح بعـمل قطاعات جيدة . وقد يوضع الحامل والعينة فى كأس به ماء ثم يوضع فى فرن على درجة حرارة ٣٥ - ٤٠° م لمدة ١٢ ساعة أو أكـثر تبعاً لحجم وطبـيعة العينة . إذا لم تـنجح هذه المعاملة فـى الحصول على النتائج المرجـوه فقد يرجع ذلك إلى أن العينـات صلبة جداً وبذلك لا تصلـح لـلقطع بطريقـة الشمـع أو أن عمليتى التجفيـف والـتشرب لـم تتم كما يجب .

(٧) تكهرب الأشرطة

من الصعوبات التى قد تـنشأ أثناء عملية القطع تكهرب الأشرطـة ؛ مما يسبب اندفاعها بقوة تجاه الأدوات الأخرى فتلتصق بها أو تلتوى علـى بعضها مما يسبب تلفها ، ويمكن تجنب ذلك بغلى ماء فى المعمل حتى ترتفـع الرطوبة إلى درجة كافية لمنع هذا التكهرب أو تقليله إلى أدنى حد ، ويمكن كذلك توصيل يد السكين بحنفية الماء بواسطة سلك .

(٨) قد يكون شريط الشمع غير مستقيم ويرجع ذلك لسبب أو أكثر مما يلى :

(أ) المنطقة المستعملة من السكين تالمة ولذا يجب تحريك السكين أو إبدالها بأخرى حادة .

(ب) السطح العلوى والسفلى للعينة غير متوازيين ولذا يجب عمل التسوية اللازمة .

(جـ) الحافة السفلية للعينة غير موازية للسكين ويلزم تنظيمها .

(د) العينة النباتية ليست فى منتصف الشمع تماما ويلزم عمل التسوية اللازمة .

(هـ) العينة نفسها غير منتظمة الشكل والحجم .

قطع العينات النباتية غير المطمورة فى شمع البارافين

أولا : القطاعات اليدوية Hand sections

يمكن عمل هذه القطاعات فى عينات نباتية حية أو محفوظة وذلك بإستعمال موسى تشريح أو شفرة حلاقة ، ويمكن بالتمرين الحصول على قطاعات رقيقة . قد تبدو هذه الطريقة دون الطرق الأخرى ولكنها تعطى تحضيرات ممتازة خاصة لدراسة الطلبة (وفى هذه الحالة يجب أن يقوم الطالب بنفسه بجمع العينات وعمل القطاعات فذلك أدعى إلى التعرف على تركيب هذه العينات حتى ولو لم تكن هذه القطاعات على جانب كبير من الجودة فذلك أفضل من فحص الشرائح المجهزة بطرق أخرى) . كما تفيد هذه الطريقة فى توفير كثير من الجهد الذى يبذله الباحث الذى يرغب فى عمل دراسة خاصة فما عليه إلا عمل دراسة شاملة للعينات ليتعرف على الصعوبات ويحدد الأجزاء الجديرة بالدراسة .

ولاشك أن الصبر والمران والمهارة الفطرية أهم ما يجب أن يتصف به الباحث حتى يتمكن من القيام بهذه العملية على الوجه الأكمل ، فالنصائح أو التوجيهات قد لا تكون ذات قيمة فى مثل هذه الأحوال .

وتجرى هذه العملية باستعمال نخاع البيلسان أو دونه ، حيث تشق قطعة من نخاع البيلسان طوليا ثم تحفر مجرى تناسب سمك العينة ، يربط النخاع والعينة بداخله ثم يوضع فى ماء فيتمدد النخاع وبذلك يغلف العينة تماما ويسهل قطعها بالموس ، ويمكن الاستعاضة عن نخاع البيلسان بجذر الجزر ويراعى أن يكون كل من الموس والعينة مبللين دائما بالماء ، تعوم القطاعات فى طبق بترى به ماء أو فى تركيز من الكحول يعادل التركيز الذى وصلت إليه العينة عند القطع ، فمثلا عند قطع عينة فى محلول F. A. A. أو غيره من محاليل القتل والتثبيت يراعى غسلها والبدء فى إجراء عملية التجفيف حتى نصل إلى ٥٠ ٪ أو ٧٠ ٪ كحول ثم تعمل القطاعات وتعوم فى التركيزات المناسبة .

إذا عملت قطاعات يدوية فى عينات حية يراعى بعد القطع قتل وتثبيت القطاعات ويستعمل لذلك محلول قتل مناسب للعينة تحت الدراسة ، ويتم القتل فى الحال غالباً إذا ما كانت القطاعات رقيقة ثم تغسل القطاعات بعد نحو ١٠ دقائق من القتل .

ويجب مراعاة فحص القطاعات قبل صبغها بعدسة جيب للتأكد من سلامتها ، وتتبع الطريقة المناسبة للصبغ سواء المفردة أو المزدوجة . إذا كانت الصبغة المفردة أو الصبغة الأولى فى حالة الصبغ المزدوج مائية يلزم أن نصل بالقطاعات إلى الماء إذا كانت قد قتلت فى الكحول أو فى محلول .F. A. A وتتبع الخطوات التالية : يضاف إلى القطاعات المختارة فى زجاجة الساعة كحول إيثايل ٥٠٪ ثم يضاف ثلث الكمية ماء ، بعد ٣ - ٥ دقائق يسكب نصف كمية السائل ويضاف كمية مساوية للمتبقى ماء ، تكرر عملية السكب والإضافة ٢ - ٣ مرات . وفى النهاية يسكب كل السائل ويضاف ماء ثم يسكب الماء وتضاف الصبغة المائية المراد استخدامها . أما إذا كانت الصبغة المراد استخدامها مذابة فى الكحول فيمكن إتباع الخطوات السابقة ، وبدلاً من إضافة الماء تضاف تركيزات متدرجة من الكحول حتى نصل إلى تركيز الصبغة .

ثانياً : القطع بواسطة الميكروتوم

(أ) القطع بواسطة الميكروتوم الثلجى Freezing microtome

تستخدم هذه الطريقة بصورة خاصة فى حالة العينات اللينة الرقيقة التى يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع ، وهى طريقة سريعة يمكن بها عمل قطاعات كبيرة كاملة . والأساس فى استعمال الميكروتوم الثلجى تبريد العينة بواسطة غاز ثانى أكسيد الكربون CO_2 أو الأثير لدرجة التجمد فى محلول مناسب لا يتبلور بالتبريد ، وبالتالى تكتسب العينة صلابة يمكن بها قطعها بسهولة . والميكروتوم الثلجى معد لعمل قطاعات بسمك محدد (بالميكرون) ميكانيكيا ومزود بجهاز للتبريد يتصل من خلال أنبوبة معدنية بأسطوانة الغاز السائل CO_2 ، عند فتح صمام الغاز يندفع الغاز بقوة على درجة حرارة منخفضة جداً فيتجمد المحلول الذى يحيط بالعينة المحملة على مائدة التبريد وبذلك تتكون كتلة صلبة متماسكة يمكن قطعها بسهولة .

ويستعمل المحلول التالى عادة فى تحميل العينات :

ماء مقطر	٢٠٠ مل
صمغ عربى	٢٠ جم
فينول أو ثيمول (مادة حافظة)	١ جم

قد يستعاض عن الصمغ بالجيلاتين أو الآجار بعمل محلول نصف سائل على درجة حرارة الغرفة ويضاف إليه مادة حافظة ١,٠٪ فينول .

يمكن باستعمال الميكروتوم الثلجى قطع العينات النباتية الحية أو المقتولة ، تجزأ العينات إلى قطع ذات حجم مناسب وتوضع فى ماء بارد ، ثم تنقل بعد فترة مناسبة إلى محلول الصمغ العربى وتترك به فترة وجيزة يعد خلالها الميكروتوم للاستعمال ، أما إذا كانت العينات مقتولة فيتم تدريجها حتى تصل إلى الماء ثم فى محلول الصمغ العربى حتى يعد الميكروتوم كما سبق فى حالة العينات النباتية الحية .

ليس الهدف من وضع العينات النباتية فى الصمغ أن تتشربه الأنسجة تماما وإنما تغلف العينات به من جميع الجهات بطبقة منتظمة من محلول الصمغ . توضع نقطة أو اثنتين من الصمغ العربى ، يتجمد المحلول ويصير أبيض اللون ، تحمل العينة وتنظم فى الوضع المناسب مع استمرار تدفق الغاز وإضافة محلول الصمغ ، عندما تصل العينة المحملة إلى درجة صلابة مناسبة تجرى عملية القطع ، وتبرد السكين لدرجة قريبة من درجة حرارة العينة . تستقبل القطاعات فى طبق بترى أو زجاجة ساعة بنقلها من فوق السكين بواسطة فرشاة ناعمة ، يذوب الصمغ وتكون القطاعات معدة للخطوات التالية من التحضير ، يراعى أن تكون القطاعات سميكة نسبياً (٣٠ - ٤٠ ميكرون) .

(ب) القطع بواسطة الميكروتوم المنزلق Sliding microtome

تستعمل هذه الطريقة إذا لم يكن ممكناً الحصول على قطاعات كاملة بطريق القطع اليدوى وذلك فى الأنسجة البالغة أو الكبيرة الحجم .

تجهز العينة بطول ٣ سم وتثبت فى ماسك الميكروتوم بحيث يبرز منها ١ سم أعلى الحافة العلوية للماسك ، وتثبت السكين فى وضع مائل على محور الانزلاق حتى تكون مائلة بالنسبة للعينة مع مراعاة وجود مسافة بين حامل السكين وماسك العينة . يراعى أن تكون العينة والسكين مبللتين دائما بالماء ، ترفع القطاعات من فوق حافة السكين بفرشاة مبللة بالماء أيضا حيث تنقل إلى طبق بترى به ماء تختبر القطاعات بعدسة جيب ويستبعد غير الصالح منها . يتبع بعد ذلك الخطوات السابق ذكرها فى القطاعات اليدوية فيما يتعلق بالتجفيف والصبغ .

مما هو جدير بالذكر أن الميكروتوم المنزلق يستعمل أيضا فى حالة العينات المطمورة فى الشمع فى حالة صعوبة قطعها بالميكروتوم الدائرى نتيجة للصلابة الزائدة للعينة أو عندما تكون هشة سهلة التكسر حيث تثبت العينة بلصقها بعد تنظيم الشمع حولها على حامل الميكروتوم وهو على شكل متوازى المستطيلات من الخشب أو البلاستيك بحجم يناسب الماسك . تستقبل القطاعات فى طبق بترى به ماء وينتخب الصالح منها ثم يلصق على الشريحة كما هو متبع فى قطاعات الشمع وتستكمل خطوات الصبغ والحفظ المستديم .

قطع العينات النباتية المطمورة فى السللويدن

إذا كان المطلوب عمل قطاع عرضى نخرج النموذج المطلوب من السللويدن الغليظ القوام وكذلك حامل مناسب به ثقب ، ثم يوضع الفرع فى الثقب بشرط أن يبرز منه ٦ – ١٠ ملليمترات ، مع وضع قطع من عود الثقاب بين جدار الثقب والنموذج لزيادة التثبيت ثم توضع كتلة من السللويدن السميك حول الفرع على الحامل ثم توضع هذه المجموعة فى الكلوروفورم لتتم عملية التصلب . أما إذا كان المطلوب عمل قطاع طولى فيوضع الفرع على كتلة غير مثقوبة ، وتحاط بالسللويدن السميك وتجرى عملية التصلب فى الكلوروفورم . إذا كانت النماذج محفوظة فى محلول حفظ (أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥٪ والجلسرين) تنقل إلى كحول مطلق مع تغييره مرتين على فترات من ٤ – ٨ ساعات ، هذه العملية تزيل الكمية الصغيرة من الماء التى قد توجد نتيجة الحفظ فى حالة التخزين كما أنها تقلل من درجة تصلب السللويدن ، ثم توضع النماذج فى محلول سللويدن سميك مع الحامل – بعد مرور ٢٤ ساعة تجرى عملية التثبيت كما سبق .

تتم عملية القطع بواسطة الميكروتوم المنزلق وفيه لا يتحرك النموذج وإنما السكين هى التى تتحرك – والسمك المعتاد القطع عليه هو ١٥ – ٢٠ ميكرونا ، ويجب أن تكون السكين والنموذج مبللين بكحول ٩٥٪ أثناء القطع وتستقبل القطاعات فى كحول ٩٥٪ – ويجب ضبط زاوية ميل السكين وانحرافها حتى نحصل على قطاعات غير ملتوية وغير متكسرة – ويمكن حفظ القطاعات السليمة فى محلول الجلسرين والكحول لحين صبغها .

٧ . لصق القطاعات على الشرائح

Affixing paraffin sections to the slide

يراعى فى البداية تجهيز شرائح نظيفة تمامًا ومحفوظة فى كحول ٩٥٪ وتجفف بقطعة من القماش الذى لا يترك أوباراً (قطعة من التريكولـين أو الحرير) ويستعمل فى عملية اللصق أحد المحاليل الآتية :

(١) محلول ماير Mayer's adhesive

ويحضر بالطريقة الآتية :

زلال بيض	Egg white	٥٠ مل
جلسرين	Glycerine	٥٠ مل
فينول	Phenol crystals	١ جم

يمكن استعمال ساليسالات الصوديوم أو ثايمول بدلاً من الفينول .

يستعمل بيض طازج - يفصل الزلال ويضاف الجلسرين والفينول ويرج جيدا حتى يتكون عدد كبير من فقاعات الهواء. يترك المحلول مدة لترتفع فقاعات الهواء إلى السطح فترتفع معها المواد الغريبة ويصبح المحلول نقياً صافياً - يزال الريم الذى يتكون على السطح ويرشح المحلول فى قماش موسلين . يجدد المحلول كل ستة أشهر . ويستعمل معه الماء لتعويم الأشرطة .

هناك تركيبة أخرى يدخل فيها الألبيومين كأساس ، ويستعمل منها خليط جاهز يسمى ألبيوزول Albusol ، وتركيب المحلول اللاصق كالآتى :

ألبيوزول	٥ مل
ماء مقطر	١٨٥ مل
فورمالين	١٠ مل

ويجدد هذا المحلول شهرياً .

(٢) محلول هاوبت Haupt's adhesive

ويحضر كالآتى :

جيلاتين	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل
جلسرين	١٥ مل
فينول بللورات	٢ جم

يذاب الجيلاتين فى الماء على درجة حرارة ٣٥° م وعند تمام الذوبان يضاف الفينول ثم الجلسرين ويقلب جيداً ثم يرشح . ويستعمل محلول فورمالين ٢ - ٤ ٪ لتعويم أشرطة الشمع .

يوجد تركيب آخر يدخل فيه الجيلاتين كأساس ، ويحضر كالآتى :

جيلاتين	١ جم
ماء مقطر	٩٠ مل
فورمالين	١٠ مل

يقوم هذا المحلول بتعويم الأشرطة ولصقها فى نفس الوقت ويحضر شهرياً .

خطوات العمل

(١) يقطع شريط الشمع إلى أشرطة قصيرة مناسبة الطول تتناسب مع طول الأغطية ، التى تستعمل فى التحميل ، ويفضل أن لا يزيد طولها عن ٤ سم .

(٢) توضع نقطة من محلول ماير أو هاوبت على الشريحة ويدهن بها السطح بتمرير إصبع نظيف عدة مرات وإزالة الزائد من المحلول ؛ حتى لا يتبقى على سطح الشريحة إلا طبقة رقيقة جداً متجانسة منتظمة الانتشار .

(٣) تنقل القطاعات أو الأشرطة المجهزة إلى الشريحة ، وتضاف عدة قطرات من الماء المقطر أو فورمالين ٢ - ٤ ٪ حسب المحلول المستعمل فى اللصق وتحرك الشريحة قليلا حتى ينتشر الماء أو الفورمالين على السطح فتطفو عليه الأشرطة .

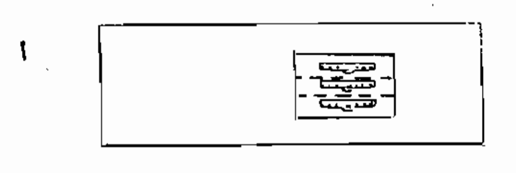
(٤) تسخن الشريحة علـى لوحة ساخنة حتى تنبسط الأشرطة ، ويـزول كل أثر لانكماشها وتجعدها ويجب ألا تسخن إلا بالقدر الـلازم لأزالة الإنكماش والتجعد ، ولا يجب أن تصل الحرارة إلى درجة انصهار الشمع فإن ذلك يتلف الأنسجة .

(٥) يزال معظم الماء أو الفورمالين الزائد بإمالة الشريـحة ولمس حافتها التى اتجه إليها السائل بقطـعة من النشـاف أو ورق الترشيح . ثم تـنظم القطـاعات أو الأشرطة بإبـرتين فى الوضع المناسب ، ويزال ما تبقى بواسطة ورقة نشاف أو ترشيح بحيث تصبح الشريحة جافة تمـاما وإلا فإن الماء أو الـفورمالين مـع اللاصق المستـعمل يأخـذ الصبغـة ويشوه الشريحة .

(٦) توضع الشريحة بعـد ذلك فى مكان دافئ غير معرض للغبار كالـطابق العلوى من فرن الشمع لمدة لا تقل عن أربع ساعات للأنسجة الرهيفة ، ولا تقل عن ١٢ ساعة للأنسجة البالغة أو الصعبة اللصق .

(٧) يجب أن يكـون التصاق شريط الشـمع بسطح الشريحـة تامًا ، لا تتخلله فـقاعات من الهواء وإلا فـإن القطاعات تـكون عرضة للـسقوط أثناء معـاملتها فـى محاليل الـصبغ المختلفة . ولا ضرر هناك من حفظ الشرائح بعـد لصق القطاعات وتجفيفها أى مدة من الزمن حتى تصبغ.

أ



ب

شكل (٧-١) : نظام لصق القطاعات على الشريحة.

أ - غطاء شريحة مربع . ب - غطاء شريحة مستطيل .

إزالة الشمع Deparaffinize

يلزم بعد لصق القطاعات على الشرائح الزجاجية أن يزال الشمع حتى يمكن القيام بالعمليات التالية من صبغ وتجفيف وترويق وتحميل .

وتجرى العملية كالآتى :

(١) تغمس الشرائح فى وعاء به زيلول نقى لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة .

(٢) تكرر عملية الغمس فى وعاء آخر به زيلول نقى لمدة ٥ دقائق .

(٣) تنقل الشرائح بعد ذلك إلى وعاء به ٥٠ ٪ زيلول لمدة ٥ - ١٠ دقائق .

(٤) يتم نقل الشرائح بعدها إلى وعاء به كحول مطلق لمدة ٥ دقائق .

(٥) تكرر عملية النقل إلى وعاء آخر به كحول مطلق لمدة ٥ دقائق .

يواصل التدرج حتى التركيز المناسب للصبغة ، فإذا كانت الصبغة مذابة فى كحول ٥٠ ٪ مثلا يتم التدرج بالشرائح إلى كحول ٧٠ ٪ ثم تنقل بعد ذلك إلى الصبغة المذابة فى كحول ٥٠ ٪ . أما إذا كانت الصبغة مذابة فى الماء فتدرج بالشرائح إلى الماء ثم إنقلها إلى الصبغة . أى بعبارة أخرى تدرج بالشرائح إلى تركيز معادل لتركيز المذيب للصبغة أو للخطوة السابقة مباشرة لتركيز مذيب الصبغة .

يمكن أن يحل الأسيتون أو كحول الأيزوبروبايل محل كحول الإيثايل بعد إذابة الشمع .

لصق القطاعات التى تعمل باليد أو بالميكروتوم الثلجى أو المنزلق

يمكن لصق القطاعات على الشرائح قبل صبغها حتى يسهل إجراء عملية الصبغ وحفظها من التلف الذى قد يصيبها أثناء الخطوات المختلفة حتى التحميل ، ويستعمل فى ذلك محلول جيلاتين فولز ويتكون من :

جيلاتين + حامض خليك ثلجى + ٧٠ ٪ كحول + شب الكروم

طريقة تحضيره :

يذاب ٤ جم من الجيلاتين فى ٢٠ مل من حامض الخليك الثلجى على حمام مائى ،

مع التـقليب . يؤخـذ من هذا المحلـول ٥ مل ويضاف إلـيها ٧٠ مل مـن كحول ٧٠٪ ثم يضاف ١ - ٢ مل من محلـول شب الكروم الذى قوته ٥٪ ، ادهن الشرائح بـالخليط ، ثم تترك لتجـف وبذا تحتفظ بقابلـيتها للانتفاخ والـلصق فى وجود الماء . انقل الـقطاعات إلى الشريحة وذلك بـتغطيس الشريحة فى طبـق البترى تحت القطاع ، ثم ترفع الـشريحة برفق وعليها القطاع فى المنتصف ، يضغط عليها بـورقة ترشيح مبللة برفق حتى يتم اللصق ، ثم تترك فى الغرفة العلوية من الفرن لتجف .

٨ . الصبغ
Staining

لا تتمكن العين البشرية من تمييز المحتويات المختلفة بالخلية بسهولة لعدم وجود قدر كافٍ من التميز بينها ، لذلك كان لزاماً صبغ القطاعات بصبغات مختلفة حتى يمكن فحص الخلايا والأنسجة مجهرياً فى سهولة ويسر .

لا توجد صبغة معينة تصلح لجميع الأغراض وتعطى المعلومات اللازمة عن مختلف الخلايا والأنسجة ، ويستعمل عادة للفحص العام نوعين من الصبغات تعطى كل منهما لوناً متميزاً عن الأخرى Stain and counterstain يمكن بواسطتهما التمييز بين النواة والسيتوبلازم ، وقد يستعمل البعض صبغة مفردة أو توافيق معينة من الصبغات للحصول على معلومات محددة تتعلق بخصائص كيميائية أو تركيبية خاصة .

ويلزم قبل استخدام أى صبغة الوقوف بقدر الإمكان على الخصائص المميزة لها ، ومازال فعل الكثير من الصبغات غير معلوم ، وإن وجد البعض الآخر الذى تحددت خصائصه فالكثير من الصبغات لها Auxochrome ، وهو الجزء الفعال من الجزئ الذى يتحد مع مكونات الأنسجة ، كما يوجد للصبغة Chromophore وهو الجزء المسئول عن اللون المميز للصبغة .

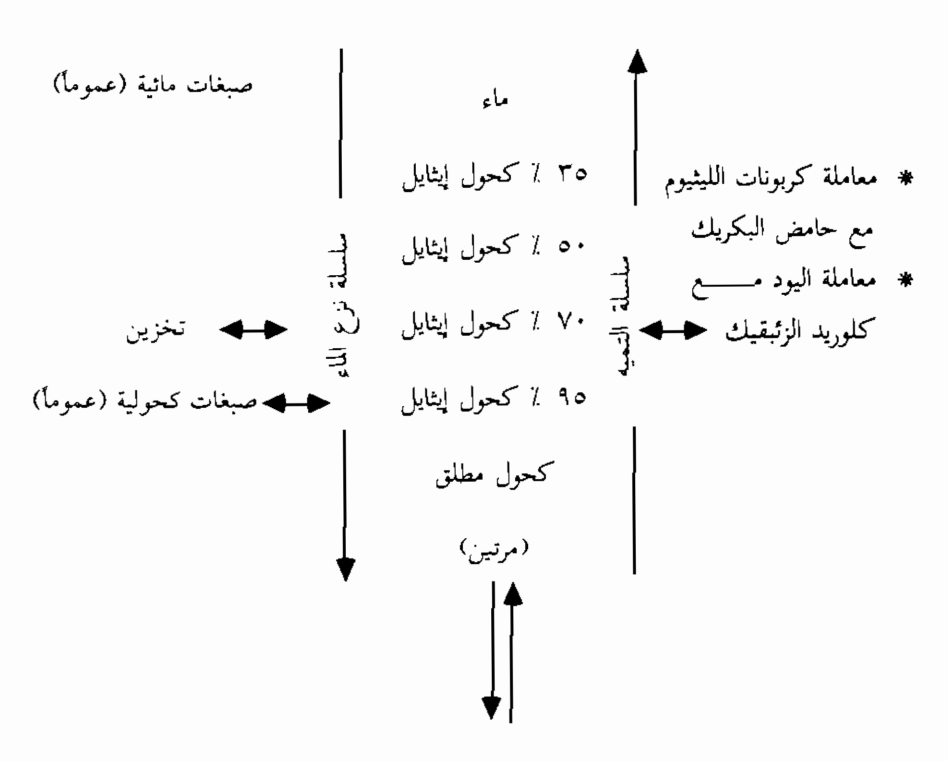
قد يتحد Auxochrome مباشرة مكوناً ملحًا مع محتوى معين من الخلية أو نتيجة الامتصاص أو بكليهما ، بعض الصبغات مثل الهيماتوكسلين Hematoxylin وهى ضعيفة جداً بمفردها يلزم لها وسيط يساعدها على الاتحاد مع الخلايا ، وهو ما يسمى بالمظهر Mordant الذى يكوّن رابطة مع مكونات الخلايا ، بينما صبغات أخرى مثل Sudan Black B تذوب مباشرة فى محتويات الخلية .

تجرى عملية الصبغ فى أوانٍ زجاجية نظيفة لعل أفضلها Coplin jars ، وفى حالة القطاعات غير المحملة مثل قطاعات الميكروتوم الثلجى أو السللويدن فيتم صبغها فى أطباق صغيرة Stender dishes أو زجاجات ساعة .

يراعى كتابة البيانات اللازمة على الأوانى وإحكام الغطاء عليها على الدوام ، وتنظف الأوانى من أى صبغات تلوثها من الخارج ، وإذا ما لزم إجراء فحص مجهرى سريع أثناء

الصبغ يراعى وضع حوض زجاجي صغير أسفل الشريحة المطلوب فحصها Lantern-slide glass حماية للمجهر من التلوث ، ويراعى عدم تعرض القطاعات للجفاف حتى يتم تغطيتها بعد وضع بيئة التحميل .

يلخص الشكل التخطيطي جدول (٨-١) الخطوات المتتابعة التى تعامل بها القطاعات أثناء الصبغ .



شرائح عليها ← زيلول نقى ← زيلول وكحول مطلق ← زيلول نقى ← تحميل وتغطية الشرائح
قطاعات بارافين (مرتين) (مرتين)

جدول (٨-١) : مخطط يوضح عمليتى التميه Hydration ، ونزع الماء Dehydration ، خلال الخطوات المتتابعة التى تعامل بها القطاعات فى عملية الصبغ.

تنقسم الصبغات تبعاً للأصل الذى تشتق منه إلى صبغات طبيعية وأخرى صناعية ، وفيما يلى شرح لكل من هاتين المجموعتين :

أولاً : الصبغات الطبيعية Natural dyes

توجد ثلاث صبغات طبيعية تستعمل مع الأنسجة النباتية ، وهذه الصبغات لم يمكن حتى الآن تحضيرها صناعياً ، وهى ذات أهمية خاصة فى الدراسات السيتولوچية ، هذه الصبغات هى :

(١) صبغة الهيماتوكسلين Hematoxylin

تستخرج هذه الصبغة من نبات *Hematoxylin campechianum* L . وتستعمل فى الدراسات الهستولوچية ، وهى من أهم الصبغات على الإطلاق ، تحضر هذه الصبغة بطريقتين أساسيتين تبعاً للغرض من استخدامها ، وهما كالتالى :

الطريقة الأولى :

يحتوى المحلول فى هذه الطريقة على الصبغة والمظهر (المثبت) Mordant والعامل المؤكسد ومادة حافظة ، ويستعمل هذا المحلول غالباً فى الأغراض التشريحية ، ويسمى المحلول باسم من حضَّره لأول مرة ، وتوجد منه ثلاثة أنواع تسمى كالتالى :

(1) Mayer's Hematoxylin

(2) Harris's Hematoxylin

(3) Delafield's Hematoxylin

وتعرف الصبغة فى هذه الحالة بأنها ذاتية المظهر Self mordant ويشار إليها عادة بالمصطلح Hemalum .

طريقة تحضير صبغة Delafield's Hematoxylin

يذاب ٤ جم هيماتوكسلين فى ٢٥ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪ ثم يضاف إلى المحلول :

٣٦ جم Ammonium alum $(NH_4Al(SO_4)_2 . 12H_2O)$

٤٠٠ مل ماء مقطر

يترك المحلول بعد ذلك لمدة أسبوع معرضاً للضوء ، مع وضع غطاء غير محكم ، ويرشح المحلول ثم يضاف ما يلى :

١٠٠ مل جلسرين

١٠ مل كحول الميثايل ١٠٠ ٪

يترك المحلول لمدة ٦ أسبوع لينضج ، يحتفظ المحلول الأساسى للصبغة بصلاحيته لما لانهاية .

الطريقة الثانية :

لا يخلط المظهر فى هذه الطريقة مع الصبغة فى محلول واحد ، بل يعامل النموذج أولاً بالمظهر (مثل شب الحديد Iron alum) ثم يتبع بالصبغة ، ومن أمثلتها :

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وتحضر كما يلى :

(أ) يجهز محلول أساسى Stock solution من الهيماتوكسلين بالتركيز التالى :

١٠ جم صبغة هيماتوكسلين

١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

يترك المحلول الأساسى للصبغة لفترة لا تقل عن ٣ شهور قبل استعماله حتى ينضج ، ثم يخفف بنسبة :

١ محلول أساسى : ٩ ماء مقطر ، ويرشح .

(ب) يتركب المظهر من شب الحديد

Iron alum (Ferric ammonium sulphate, $Fe\ NH_4\ (SO_4)_2\ .12H_2O$

وتستخدم البللورات البنفسجية فقط حيث تتحلل البلورات البنية ، ويجهز المحلول بالتركيز التالى :

- المظهر Mordant ٤ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر .
- للتمييز Differentiator ٢ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر.

ويرشح المحلول قبل الاستعمال .

(٢) صبغة البرازيلين Brazilin

يمكن الحصول على هذه الصبغة من مجموعة أشجار مختلفة ، تعرف بغابات البرازيل Brazilwood وإن كانت تستخرج أساساً من نبات *Caesalpinia crista* أو *C. echinata* وتستعمل حالياً بكثرة لصبغ تحضيرات الدهك Smears .

تستعمل صبغة البرازيلين عادة بتركيز ٥ر٠ ٪ فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ ، وتخزن لنحو أسبوع قبل الاستعمال لتنضج ، والبرازيلين ليست صبغة بذاتها ، وإنما ينتج تأثيرها عقب تفاعلها مع المظهر شب الحديد Ferric ammonium sulphate .

(٣) صبغة الكوشينيل Cochineal

تستعمل أيضاً مشتقاتها Derivatives الكارمين Carmine وحمض الكارمينيك Carminic acid ويمكن الحصول عليها بعد طحن الأجسام المجففة لإناث حشرة الكوشينيل حيث ينتج مسحوق لونه أحمر مصفر ، ويمكن الحصول على الكارمين ذى اللون الأحمر اللامع بعد إضافة محلول الشب إلى الكوشينيل . وللكارمين أهمية فى الدراسات السيتولوچية كما فى حالة الأسيتوكارمين Aceto-carmine .

ثانياً : الصبغات الصناعية Coal-tar dyes

تستخرج كل صبغات هذه المجموعة من قار الفحم Coal-tar وهى كثيرة العدد جداً وسيكون مجال اهتمامنا بهذه المجموعة فيما يستخدم منها فى الأغراض النباتية . وتحضر صبغات هذه المجموعة باستخدام أحد المذيبات المذكورة بجدول (٨-٢) ، وعادة ما تحضر الصبغات بالتركيزات التالية :

(١) ٥ر٠ - ١ ٪ فى الماء المقطر .

(٢) ٥ر٠ - ١ ٪ فى كحول الإيثايل ٥٠ ٪ أو ٧٠ ٪ أو ٩٥ ٪ .

(٣) محلول مشبع فى زيت القرنفل أو فى حجوم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق (أى بنسبة ١ : ١) ، وقد يستبدل الكحول بالميثايل سيلوزولف Methyl cellosolve أو فى حجوم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق والميثايل سيلوزولف .

جدول (٨-٢) : المذيبات الأساسية (×) التى تستخدم فى تحضير الصبغات الصناعية المستعملة فى الأغراض النباتية

الصبغة	المذيب		
	ماء مقطر	كحول إيثايل ٪	زيت قرنفل
١ - الفوكسين الحامضى Acid Fuchsin (acid)	×	٪ ٧٠	
٢ - أزرق الأنيلين Anilin Blue (acid)	×	٪ ٥٠	
٣ - أزرق القطن Cotton Blue (acid)	×	٪ ٥٠	
٤ - بنى البسمارك Bismarck Brown Y (basic)		٪ ٧٠	
٥ - البنفسجى المتبلور Crystal Violet (basic)	×		×
٦ - الإيوسين Eosin Y (acid)		٪ ٩٥	
٧ - الإرثروسين Erythrosin (acid)		٪ ٩٥	×
٨ - الأخضر السريع Fast Green (acid)		٪ ٩٥	×
٩ - البرتقالى الذهبى Golden Orange (acid)		٪ ١٠٠	×
١٠- السفرانين Safranin O (basic)	×	٪ ٥٠ - ٩٥	×

الاستعمالات النباتية الأساسية للصبغات الشائعة

The principal botanical uses for the common stains

(١) الجدر السيليولورية Cellulose cell walls

- الهيماتــوكسلين ذاتيــة المظهر (زرقاء اللون) Hematoxylin (self-mordanting type)
- الأخضر السريع Fast green FCF.
- أزرق الأنيلين Anilin blue
- بنى البسمارك Bismarck brown Y.
- الفوكسين الحامضى Acid fuchsin

- أحمر الكونغو Congo red
- الأخضر الضوئى Light green

(٢) الجدر الملجننة للخلايا Lignified cell walls

- السفرانين Safranin (حمراء اللون)
- البنفسجى المتبلور Crystal violet

(٣) الجدر المكوتنة للخلايا Cutinized cell walls

- السفرانين Safranin
- البنفسجى المتبلور Crystal violet
- الإرثروسين Erythrosin (قرنفلية اللون)

(٤) الصفيحة الوسطى Middle lamella

- الهيماتوكسلين (غير ذاتية المظهر) Iron Hematoxylin
- أحمر الروثينيوم Ruthenium red (material cut fresh)

(٥) الكروموسومات Chromosomes

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin
- السفرانين Safranin
- الكارمين Carmine (for acetocarmine smears) (حمراء اللون)

(٦) الميتوكوندريا Mitochondria

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin

(٧) السيتوبلازم Cytoplasm

- أيوسين Eosin Y.
- الإرثروسين Erythrosin B.

- الأخضر السريع Fast green FCF
- البرتقالى الذهبى Orange G

(٨) هيفات الفطر فى أنسجة العائل Filamentous fungi in host tissues

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin
- السفرانين Safranin
- الأخضر السريع Fast green FCF

(٩) الكالوز Callose

- أزرق الأنيلين Anilin blue
- الريزوكرين الأزرق (متخصصة) Resocrin blue

يُحمل اللون بالشق القاعدى بالصبغة القاعدية (basic) وبالشق الحامضى بالصبغة الحامضية (Acid) ، وكقاعدة عامة تستعمل الصبغة القاعدية فى صبغ التراكيب النووية Nuclear structures وفى بعض الحالات الجدر الملجننة . أما الصبغات الحامضية فتستعمل فى صبغ السيتوبلازم والجدر غير الملجننة .

ويستعمل بعد الصبغ بعض المروقات مثل زيت القرنفل Clove oil وزيت السيدر Cedar oil وزيت البرجموت Bergamot oil وزيت أخضر الشتاء Wintergreen oil وتستعمل هذه الزيوت عادة مركزة كما تشترى أو تخفف بقليل من الزيلول Xylene . كما يستعمل المروق Carbol xylene وهو رخيص الثمن ويقوم بالعملية على أحسن وجه ويتكون من حجم من الفينول المنصهر مخلوطاً بثلاثة أو أربعة حجوم من الزيلول .

صبغ قطاعات شمع البارافين Staining paraffin sections

تصبغ القطاعات باستعمال صبغة مفردة ، أو مزدوجة ، وأحياناً تستعمل ثلاث أو أربع صبغات ، وفيما يلى بعض الأمثلة لهذه الأنظمة من الصبغات ، مع وجود جدول يوضح الخطوات المتتالية لكل طريقة للصبغ ، ينصح بتكبيره ووضعه أمامك على جدران المعمل للاستعانة به أثناء إجراء عملية الصبغ .

أولاً : الصبغة المفردة

مثال ذلك صبغة الهيماتوكسلين سواء كانت ذاتية المظهر أو منفصلة المظهر ، وفيما يلى طريقة استخدام كل منهما :

(أ) صبغة الهيماتوكسلين (ذاتية المظهر) Mayer's Hemalum Hematoxylin

يستعمـل فى هذه الحالة صبغة من الـتى يوجد المظهر مختـلطاً بها Self-mordanting type (جدول ٨-٣ أ و ب) وهى تـستعمل أساسـاً فى صبغ الجدر الســليولوزية والبـكتين وميسيليوم الفطريات وتستخدم أيضاً فى صبغ النوايات فى طور السكون كما يمكن أن تستعمل منفردة فى صبغ الأنسجة المرستيمية أو التى بدأت فى التميز .

يتحول لـون الأنسجة بعد صبـغها بالهيمـاتوكسلين وغمســها فى ماء الحنفيـة من اللون الإرجوانى Purple إلى الأزرق Blue وتعطـى لونًا إرجوانيًا محـمرًا ، إذا غمسـت فى ماء حامضى ، وأزرق إذا غـمست فى ماء قلوى . ويـفضل اللون الأزرق ، وإذا لم يـظهر هذا اللون بعد غمـس الشرائح فى ماء الحنفية فيمـكن استعمال ١ر٠ ٪ من كربونـات الصوديوم لإظهار هذا اللون .

يراعـى عنـد فحـص الشـرائح أن تكـون النـوايات ذات لـون أسود مـزرق ، والجدر السليولوزية لونها أسود ، أما الجدر الملجننة فـتكون عديمة اللون تقريباً ، والبلاستيدات بلون أزرق خفيف إلى أسود مزرق والسيتوبلازم رمادى مزرق .

إذا فحصت الشريحة وهـى فى الماء بعد صبغها ، ولم تظهر الألوان سـابقة الذكر تعاد الشريحة إلى الصبـغة لفترة أخرى حتى تأخذ الألوان المطلوبة ، وإذا تـركت الشريحة أكثر من اللازم فى الصبغة ، وصار لونها أسود ، فمن الممكن إزالة الزائد من الصبغة بغمسـها فى محلول حامـضى خفيف (٥ر٠ ٪ حامـض هيدروكلـوريك أو ١ ٪ حامض سـتريك ، أو محلول مائى مشبع لحـامض البكريك) ثم تغسل بالماء ، وتغمس فى مـحلول قلوى للتعادل وتفحص .

جدول (٨ - ٣ أ) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر .

م	المحلول	المدة بالدقيقة
(١)	زيلول نقى	٢ - ٥
(٢)	زيلول وكحول مطلق (١:١)	٢ - ٥
(٣)	كحول مطلق (١)	٢ - ٥
(٤)	كحول مطلق (٢)	٢ - ٥
(٥)	كحول ٩٥ ٪	٢ - ٥
(٦)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(٨)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(٩)	ماء مقطر	١ - ٢
(١٠)	صبغة الهيماتوكسلين	٢ - ٣٠
(١١)	ماء مقطر	١
(١٢)	ماء الصنبور لإزالة الزائد من الصبغة	١
(١٣)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(١٤)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(١٥)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(١٦)	كحول ٩٥ ٪	٥ - ١٠
(١٧)	كحول مطلق (١)	٥ - ١٠
(١٨)	كحول مطلق (٢)	٥ - ١٠
(١٩)	زيت قرنفل (مروق)	٥ - ١٠
(٢٠)	زيلول (١)	٥
(٢١)	زيلول (٢)	٥
(٢٢)	زيلول (٣)	٥
(٣٣)	التحميل والتغطية (يستخدم فى التحميل كندا بلسم أو أى بيئة تحميل أخرى)	

STAINING CHART

Progressive Hemalum

Xylene 2-5 min (de-waxing) ↓ absolute (anhydrous) alcohol 2-5 min ↓ 95 % alcohol 2-5 min ↓ 70 & alcohol 2-5 min ↓ 50 % alcohol 2-5 min ↓ 30 % alcohol 2-5 min ↓ distilled water 1-2 min ↓ Hemalum 2-30 min ↓ distilled water 1 min ↓ Tap water └──────────→	resin and Cover glass ↑ xylene III 5 min ↑ xylene II 5 min ↑ xylene I 5 min ↑ carbol- xylene 5-10 min ↑ absolute alcohol II 5-10 min ↑ absolute alcohol I 5-10 min ↑ 95 % alcohol 5-10 min ↑ 70 % alcohol 5-10 min ↑ 50 % alcohol 5-10 min ↑ 30 % alcohol 2-5 min

جـــــدول (٨-٣ ب) خـطـــــوات الصبـــغ بالهيمـاتوكسلـين ذاتيـــة المظهـــر.

. (ساس Sass ١٩٦١) Mayer's Hemalum Hematoxylin

(ب) صبغة الهيماتوكسلين (منفصلة المظهر)

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وهى من أهم الصبغات المستخدمة فى الأغراض السيتولوجية . كما تعد أيضاً من أكثر الصبغات استعمالاً فى طريقة السللويدن (جدول ٨-٤) .

خطوات الصبغ :

	المحلول	المدة بالدقيقة
(١)	زيلول نقى	٢ - ٥
(٢)	زيلول وكحول مطلق (١ : ١)	٢ - ٥
(٣)	كحول مطلق	٢ - ٥
(٤)	كحول مطلق	٢ - ٥
(٥)	كحول ٩٥ ٪	٢ - ٥
(٦)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(٨)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(٩)	ماء مقطر	١ - ٢
(١٠)	٤ ٪ شب الحديد (مظهر)	٦٠(إلى اليوم التالى)
(١١)	ماء مقطر (٥ تغييرات)	١
(١٢)	٠,١ ٪ صبغة هيماتوكسلين (تترك العينات بالصبغة نفس فترة وجودها بالمظهر)	٦٠(إلى اليوم التالى)
(١٣)	ماء مقطر (٣ تغييرات)	١
(١٤)	٢ ٪ شب الحديد (التمييز)	

تترك الشرائح ٥ دقائق ، تأخذ القطاعات لونًا اسود رماديًا ، تتابع القطاعات بالفحص المجهرى حتى يصبح لون السيتوبلازم رمادياً والنوايات سوداء ، تترك القطاعات مغمورة فى محلول شب الحديد . ولعنصر الوقت دور هام فى هذه الخطوة حيث تتميز الأنسجة بسرعات مختلفة ، لذلك تلزم دقة الملاحظة ، وعموماً يلزم لغالبية الشرائح نحو ١٠ دقائق للتميز ، وإذا كان تميز الخلايا سريعاً يستعمل محلول ١ ٪ شب الحديد .

(١٥)	ماء صنبور لإزالة شب الحديد ، يعطي وجوده لوناً باهتاً للقطاعات	٥
(١٦)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(١٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(١٨)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(١٩)	كحول ٩٥ ٪	٥ - ١٠
(٢٠)	كحول مطلق (١)	٥ - ١٠
(٢١)	كحول مطلق (٢)	٥ - ١٠
(٢٢)	زيت قرنفل (مروق)	٥
(٣٣)	زيلول نقى (١)	٥
(٢٤)	زيلول نقى (٢)	٥
(٢٥)	زيلول نقى (٣)	٥
(٢٦)	التحميل والتغطية	

ملحوظة : يمكن أن تطلب الأمر استخدام صبغ مزدوج إضافة صبغة البرتقالى الذهبى Golden orange عقب خطوة الكحول ٩٥ ٪ وتتركب من :

١ جم صبغة البرتقالى الذهبى

١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

٤ مل حامض هيدروكلوريك (0.1 N) .

STAINING CHART

Iron Hematoxylin

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى
صبغة الهيماتوكسلين

4% iron alum
4 hr.
↓
dist. water
5 changes
1 min. intervals
↓
hematoxylin
4 hr.
↓
dist. water
3 changes
↓
destaining reagent
until differentiated
↓
dist. water
3 changes
↓
running
tap water
5 min. ⟶

30%
alcohol
↑
50%
alcohol
↑
70%
alcohol
↑
95%
alcohol
↑
absolute
alcohol I
↑
absolute
alcohol II
↑
carbol-
xylene
↑
xylene I
↑
xylene II
↑
xylene III
↑
resin and
cover glass

جدول (٨-٤) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين منفصلة المظهر
Heidenhain's iron alum Hematoxylin
الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣)
(ساس Sass ١٩٦١) .

ثانيا: الصبغ المزدوج

يقصد به استعمال صبغتين تقوم كل منهما بتلوين نسيج أو أكثر ، وبذا تظهر كل الأنسجة بوضوح وتصبح الدراسة وتمييز التركيب أمراً يسيراً . وتوجد طرق عديدة لكثرة مايوجد من صبغات ، ولكن سنقتصر على ذكر أكثرها شيوعاً مثل :

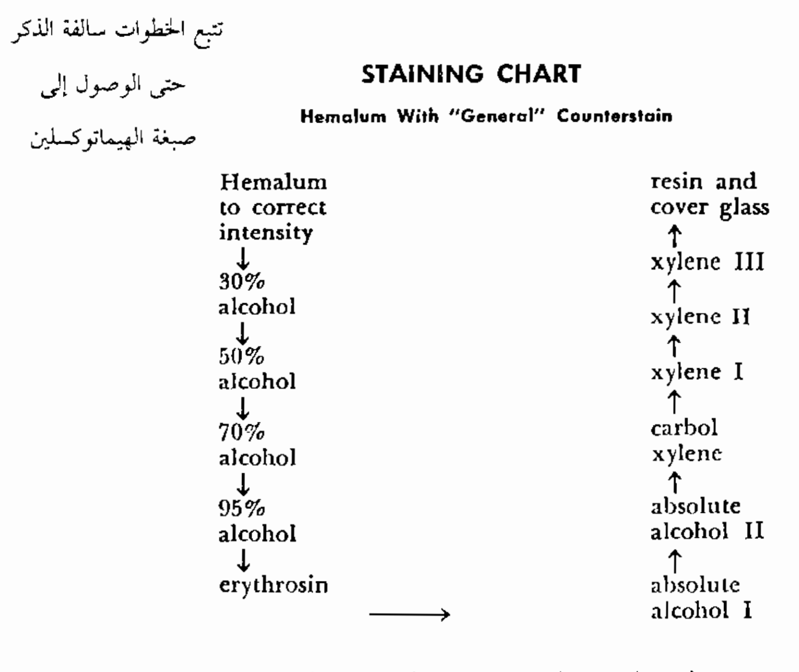
(١) صبغة الهيماتوكسلين والإرثروسين Hemalum and Erythrosin

تستعمل صبغة الإرثروسين فى هذه الطريقة كصبغة مضادة Counterstain وهى تساعد على التمييز بين الأنسجة وبعضها البعض لوجود تفاوت فى اللون بينهما ، ويجب ملاحظة

أن الصبغة المضادة لا تكون من الصبغات عالية التخصص بل تكون محدودة التخصص ، وتساعد على الرؤيا نتيجة لاختلاف اللون بالنسبة للصبغة الأساسية ، تتلون الخلايا الملجننة والنوايات باللون الأسود بينما تتلون الجدر السليولوزية باللون الأحمر الوردى أو القرنفلى . يمكن فى هذه الطريقة الاستعاضة عن الإرثروسين بالصبغات الآتية : Fast green - Eosin - Golden orange - Light green مع بقاء الهيماتوكسلين كصبغة أساسية .

خطوات الصبغ

تستعمل الخطوات السابق ذكرها فى طريقة الصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر حتى نصل إلى صبغة الهيماتوكسلين ، وتوضع الشرائح فى هذه الصبغة المدة اللازمة ثم تنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم إلى كحول ٥٠ ٪ ثم إلى كحول ٧٠ ٪ ثم إلى كحول ٩٥ ٪ ثم إلى صبغة الإرثروسين (٥ر٠ ٪ فى كحول ٩٥ ٪ أو يمكن استعمال ٥ر٠ ٪ فى زيت القرنفل) ثم تنقل إلى كحول مطلق (تغييرتين) ثم إلى كاربول زيلين Carbole xylene ثم إلى زيلول (تغييرتين) مع مراعاة نفس الفترات بالخطوات المتتالية ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٥) .



جدول (٨-٥) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين والإرثروسين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨ - ٣) (ساس Sass ١٩٦١).

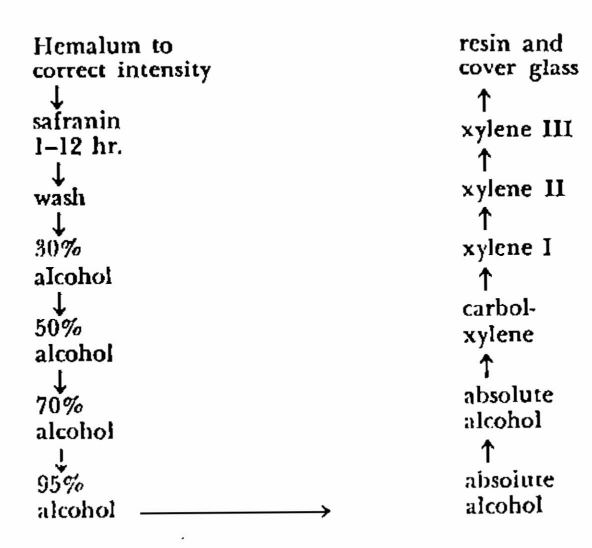
(٢) صبغة الهيماتوكسلين والسفرانين Hemalum and Safranin

تأخذ الخلايا الملجننة لونًا أحمر رائقًا وواضحًا ، أما الخلايا غير الملجننة فيكون لونها أزرق فى نهاية عملية الصبغ وقبل التحميل ، وقد تأخذ البلاستيدات الملونة اللون الأزرق أو البنفسجى أو الأحمر . إذا ظهر أن لون السفرانين أقل مما يجب أو أكثر مما يجب فيمكن إعادة الشريحة إلى السفرانين لزيادة اللون أو إزالة الزائد من السفرانين بالإذابة فى أحد التركيزات العالية للكحول (وجد أن كحول ٩٠ ٪ و ١٠٠ ٪ ذات قدرة ضعيفة على إزالة الصبغة) ، إذا كان لون السفرانين أكثر من الحد المطلوب يمكن ترك الشريحة فى خليط من الزيلوفينول لمدة تتراوح بين ٤ إلى ١٢ ساعة ، فقد ثبت أن هذا المحلول له تأثير بسيط جداً فى إزالة الزائد من السفرانين ، ولذا نترك الشريحة فيه مدة طويلة دون خوف من اختفاء الصبغة (جدول ٨-٦) .

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى
صبغة الهيماتوكسلين

STAINING CHART

Hemalum and "Specific" Counterstain



جدول (٨-٦) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين والسفرانين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).

خطوات الصبغ

بعد الوصول بالشريحة إلى صبغة الهيماتوكسلين توضع فيها للمدة اللازمة ، ثم تنقل الشريحة بعد ذلك إلى السفرانين (١ ٪ فى الماء) لمدة ١-١٢ ساعة ، تنقل بعدها إلى الماء (غسيل) ثم إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية .

(٣) صبغة السفرانين والأخضر السريع Safranin and Fast green

وهى الطريقة القياسية Standard method والأكثر استخداماً مع الأنسجة النباتية للتمييز بين الأجزاء الملجننة والسليولوزية من جدر الخلايا ، وتجرى بتمرير الشريحة فى أوانى الصبغ المختلفة حتى الوصول إلى الماء ثم تنقل إلى السفرانين المائى (١ ٪ فى الماء المقطر) لمدة ١-١٢ ساعة ثم تنقل الشريحة إلى الماء أو تترك مع تغيير الماء حتى يصبح الماء غير ملون ، ثم تنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم إلى الأخضر السريع (١ ٪ فى كحول ٩٥ ٪) وتترك لمدة ٥ - ٣٠ ثانية ، تنقل بعد ذلك إلى كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم إلى زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٧).

تتأثر كل من الصبغتين المستعملتين بالكحول أثناء التجفيف وذلك لقابليتهما للذوبان فى الكحول . كما تؤثر كل منهما على الأخرى ، ولذا فطريقة الصبغ بهاتين الصبغتين تحتاج إلى دقة ومران وخبرة كافية . وفى النهاية يجب أن تكون الخلايا الملجننة والكروماتين والنوية وأحياناً الكيوتين ذات لون أحمر لامع والبلاستيدات الخضراء قرنفلية اللون إلى حمراء والجدر السليولوزية والسيتوبلازم ذات لون أخضر .

إذا كان الأخضر السريع يزيل لون السفرانين نتيجة لتركيزه الزائد فيمكن تخفيف محلول الصبغة بنسبة ١ : ٥ من الكحول ٩٥ ٪ . وإذا كان لون السفرانين لازال فى الجدر السليولوزية رغم صبغة الأخضر السريع فيمكن إعادة الشريحة إلى الأخضر السريع ومضاعفة المدة السابقة ثم تجفيفها . إذا ظهر بعد الفحص أن السفرانين ضعيف يعاد صبغ الشريحة من البداية كأنها لم تصبغ من قبل .

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى الماء

STAINING CHART

Safranin-Fast Green

Aqueous safranin 1–12 hr.		resin and cover glass
↓		↑
water, change until colorless		xylene III
↓		↑
30% alcohol		xylene II
↓		↑
50% alcohol		xylene I
↓		↑
70% alcohol		carbol-xylene
↓		↑
95% alcohol		absolute alcohol III (optional)
↓		↑
		absolute alcohol II
		↑
fast green in 95% alcohol 5–30 sec.	⟶	absolute alcohol I

جدول (٨-٧) : خطوات الصبغ بالسفرانين والأخضر السريع

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).

يمكن أن يحل محل الأخضر السريع الصبغات الآتية : الأخضر الضوئى - أخضر المالاكيت - أو صبغة مضادة زرقاء مثل أزرق الأنيلين أو البنفسجى المتبلور أو أزرق الميثيلين وكل هذه الصبغات تذوب فى كحول ٩٥ ٪ أو فى كحول ٥٠ ٪ أو فى زيت القرنفل وتدرج ضمن الخطوات السابق ذكرها فى الموضع المناسب لتركيز المذيب .

وتحضر المحاليل المستعملة كما يلى :

صبغة السفرانين :

يذاب ١ جم صبغة سفرانين فى ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪ ، وعند الاستعمال يخفف المحلول بالماء المقطر (١:١) .

صبغة الأخضر السريع :

٥ر٠ جم صبغة أخضر سريع

٥٠ مل زيت قرنفل

٥٠ مل كحول مطلق

محلول الترويق :

٥٠ مل زيت قرنفل

٢٥ مل كحول مطلق

٢٥ مل زيلول نقى

(٤) صبغة الإرثروسين والبنفسجى المتبلور Erythrosin and Crystal violet

تفضل هذه الـطريقة إذا كان نسيج الخشب حـديثاً أو ضعيف التلجنن . تمـرر الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم ينقل إلى البنفسجى المتبلور (١ ٪ فى الماء) لمدة ١٥ دقيقة ثم تغسل فى الماء وتنقـل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم إلى كحول مـطلق ثم تنـقل إلى صبغة الإرثروسين لمدة ١-٢ دقيقة ثم تنقل إلى ٥٠ ٪ زيلول ثم إلى زيـلول نقى ٢-٣ مرات ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٨) .

تحضر صـبغة الإرثروسين بإذابة ٢ جـم من الصبغة فى ٢٥ مل كحـول مطلق ثم يضاف إلى المحلول ٧٥ مل زيت قرنفل .

هذه الطريقـة تحتاج إلى ملاحظة ودقة فائقـة والفحص بعد الصبغ بـالإرثروسين حيث يحل محل البنفسجى المتبلور فى الأنسجة الملجننة . ونتيجة الصبغ تكون الخلايا الملجننة ذات لون بنفسجى لامع والجدر السليولوزية ذات لون أحمر وردى . ويراعى التخلص تماماً من آثار زيت القرنفل حتى لا يتأثر لون الأنسجة ويزول مع الوقت ، فضلاً عن ظهور نقط زيتية عند فحص الشريحة .

STAINING CHART
Crystal violet - Erythrosin

تتبع الخطوات سالفة الذكر حتى الوصول إلى الماء	
aqueous Crystal violet 15 min	resin and cover glass
↓	↑
rinse in water	xylene III
↓	↑
30 % alcohol	xylene II
↓	↑
50 % alcohol	xylene I
↓	↑
70 % alcohol	clove oil + xylene
↓	↑
95 % alcohol	
↓	
absolute alcohol	
↓	
erythrosin 1-2 min	⟶ clove oil

جدول (٨-٨) : خطوات الصبغ بالإرثروسين والبنفسجى المتبلور

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١) .

(٥) صبغة البنفسجى المتبلور والأيودين Crystal Violet-Iodine

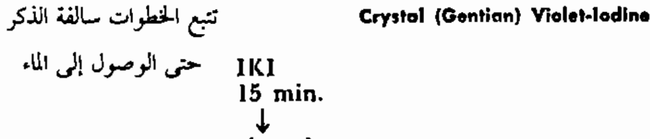
تعرف بطريقة نيوتن Newton وهى من الصبغات الهامة التى تستعمل فى الأغراض السيتولوچية (جدول ٨-٩) . فى هذه الطريقة تمرر الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم ضع الشريحة فى محلول اليود (IKI) لمدة ١٥ دقيقة ، بعد ذلك تنقل إلى الماء لفترة بسيطة ثم تنقل الشريحة إلى البنفسجى المتبلور (٢٥ر٠ - ٥ر٠ ٪ فى الماء) لمدة ١-٤ ساعات . تغسل الشريحة فى الماء ثم تنقل إلى محلول يود آخر لمدة ١٥ دقيقة ثم تشطف فى الماء ، تنقل الشريحة إلى حامض البكريك فى كحول ٥٠ ٪ (شبع ٥٠ ٪ كحول بحامض البكريك) لمدة

٣٠ ثانية ، ثم تنقل إلى كحول ٩٥ ٪ لمدة ١٠-٦٠ ثانية ، ثـم كحول مطلق لمدة ٣٠ ثانية مرتين ، ثم تنقل الشريحة إلى إناء يحتوى على كحول مطلق وزيلول وزيـت السيدر بنسبة الثلث لكل منهم لمدة ٣٠ - ٦٠ ثانية. نختبر الشريحة ثم تنقل إلى زيلول مرتين، ثم تحمل وتغطى. فى هذه الطريقة تصبغ الكروموسومات باللون الأزرق المسود فى وسط غير ملون .

يحضر الأيودين بوتاسيوم أيوديت (IKI) كما يلى :

١٠٠ مل ماء + ١ جم يودور بوتاسيوم + ١ جم يود

تخصص أوانـى التجفيف فى هـذه الطريقة ؛ أى لا تستـعمل الكحولات المختـلفة فى غرض أخر حتى لا يحدث تلوث بصبغة أخرى فتضـر بالعملية . عند الوصول إلى الكحول ٩٥ ٪ يجب الإسراع طالما كانت الـصبغة لا تلون الخطوات التالية بشكـل واضح . يستعمل زيت السيـدر حتى يقلل التبـخير أثناء الفحـص . إذا ظهر لون أزرق فى السيتـوبلازم تعاد الشريحة إلى الكحول وإذا ظهرت الكروموسومات بلون باهت يعاد صبغها من البداية .



STAINING CHART

Crystal (Gentian) Violet-Iodine

تتبع الخطوات سالفة الذكر حتى الوصول إلى الماء

IKI 15 min.
↓
rinse in water
↓
crystal violet 1–4 hr.
↓
rinse
↓
IKI 15 min.
↓
rinse
↓
50% alcohol picric acid 30 sec.
↓
95% alcohol 10–60 sec. ⟶
absolute alcohol I 30 sec.
↑
absolute alcohol II 30 sec.
↑
⅓ absolute alcohol, ⅓ xylene, ⅓ cedar oil 30–60 sec.
↑
examine
↑
xylene I
↑
xylene II
↑
xylene III
↑
resin and cover glass

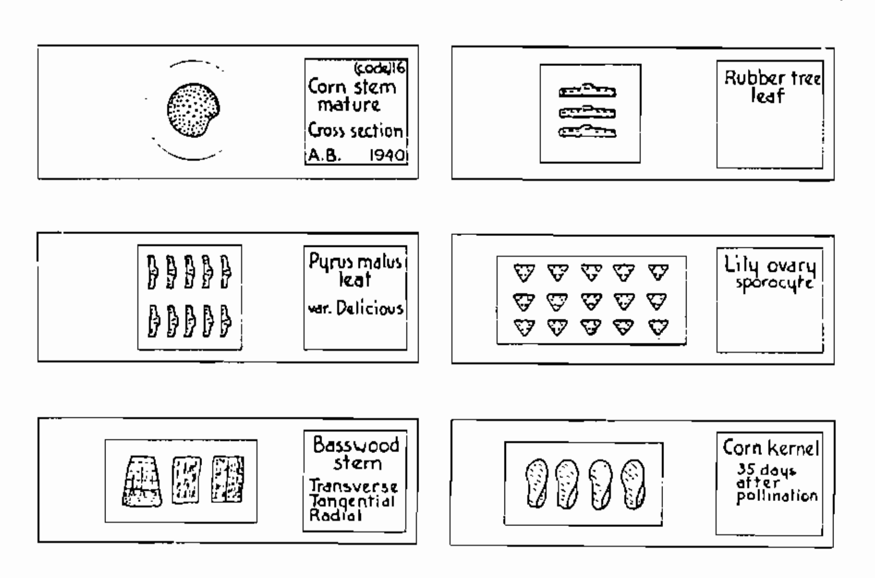
جدول (٨-٩) : خطوات الصبغ بالبنفسجى المتبلور والأيودين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).

٩ . التحميل والتغطية

Mounting and Covering

تستعمــل فـى ذلك أغطية نظيفــة جافـة بحيـــث تناسب اتساع القطـاع أو القطاعات (شكل ٩-١) ويحدث فى العادة تحول فى لون بيئة التـحميل ويزول لون القطاعات بالتخزين من الخارج إلى الداخل أى من حافة الغطاء إلى الداخل ، ولذلك يستحسن أن يترك حوالى ٥ مم بين القطاعات وحافات الغطاء .



شكل (٩-١) : تحميل وتغطية القطاعات ، ووضع بطاقة البيانات على الشريحة ، لاحظ التناسب بين حجم وعدد القطاعات وغطاء الشريحة المستخدم.

ويستعمل فى التحميل عدة بيئات مختلفة أهمها ما يلي:

(١) كندا بلسم Canada balsam

يحصــل عليها مــن نبات *Abies balsamea* من المخـروطيات ، وتعـتبر أكثـر المواد اســتخداماً منذ زمن بعيد ، وتظل القطاعات المحـملة فيه ما يقرب من ٢٥ سنة بحالة مرضية

تماماً ، ويراعى عدم تعريض الشرائح لدرجات حرارة مرتفعة أو ضوء شديد ؛ حتى لا تتأثر وتصبح غامقة اللون ، ويحسن حفظ الكندا بلسم فى زجاجات غامقة اللون أو فى أماكن مظلمة .

(٢) دامار بلسم Dammar balsam

يمتاز عن الكندا بلسم بعدم تأثر ألوان القطاعات المحملة فيه .

(٣) يوبرال Euparal

يوجد على صورتين ، فقد يكون عديم اللون ، وقد يضاف إليه لون أخضر Euparal vert وذلك لاحتوائه على أحد أملاح النحاس ، ويستعمل فى تحميل القطاعات المصبوغة بالهيماتوكسلين ، تنقل القطاعات من الكحول ٩٥ ٪ أو ١٠٠ ٪ إلى بيئة التحميل مباشرة أو من مذيب البيئة إلى بيئة التحميل (ويسمى Essence d'euparal) .

(٤) اللاكتوفينول Amann's medium

ويحضر كما يلى :

حامض الكربوليك (فينول بللورات)	٢٠ جم
حامض اللاكتيك	٢٠ جم
جلسرين	٤٠ مل
ماء مقطر	٢٠ مل

ويستعمل إما رائقاً أو مضافاً إليه إحدى الصبغات الحامضية المناسبة (بنسبة ١ ٠ر - ٥ ٠ر ٪) وغالباً ما يضاف صبغة أزرق القطن Cotton blue .

(٥) غروى الجلسرين Glycerine jelly

ويحضر كما يلى :

جيلاتين	١ جزء
ماء	٦ جزء
جلسرين	٧ جزء
فينول	١ جم لكل ١٠٠ مل من المخلوط السابق

ينقع الجيلاتين فى الماء لمدة ساعتين ثم يضاف الجلسرين ثم الفينول - يسخن المخلوط لمدة ١٥-٢٠ دقيقة (دون غليان) مع التقليب حتى يصير المخلوط سائلاً رائقاً متجانساً ، يرشح المخلوط وهو ساخن خلال موسلين ضيق الثقوب .

(٦) الراتنجات الصناعية Synthetic resins

توجد بعض الراتنجات التى تنتج صناعياً تفوق فى جودتها الكندا بلسم مثل Clarite وهو عديم اللون متجانس التركيب سريع الجفاف - ويستعمل فى تحميل القطاعات النباتية بتركيز ٨٠ ٪ فى الزيلول .

خطوات إجراء التحميل والتغطية

يتم التخلص من محلول الزيلول الزائد على الشريحة بإمالتها واستقبال ما يزيد من الزيلول على ورقة ترشيح أو قطعة من القماش ، توضع نقطة من بيئة التحميل أو أكثر تبعاً لمساحة الغطاء (مع مراعاة السرعة فى إجراء هذه الخطوة حتى لا تجف القطاعات) ، توضع حافة الغطاء مستندة إلى الشريحة والغطاء مائلاً بزاوية ٤٥° تقريباً ، يترك الغطاء ليهبط ببطء على بيئة التحميل مستنداً إلى طرف إبرة التشريح حتى يستقر تماماً فوق الشريحة ، مع التخلص تماماً من أية فقاعات هوائية فى بيئة التحميل ، ويراعى أن يكون الغطاء المستعمل جافاً تماماً وذلك بتسخينه على لهب ضعيف ، ويفضل إجراء التحميل فوق سطح أسود اللون حتى يسهل رؤية فقاعات الهواء التى قد تتكون أثناء إجراء هذه العملية .

يراعى أن لا تزيد كمية بيئة التحميل عن اللازم حتى لا تسيل على حواف الغطاء وأحياناً فوقه ، تجفف الشرائح بعد ذلك بوضعها فى فرن على درجة حرارة ٣٥-٤٠° م لمدة يوم أو أكثر حتى تمام جفاف بيئة التحميل ؛ ليمكن تداول الشرائح دون خوف من انزلاق الغطاء . إذا كانت بيئة التحميل المستعملة غروى الجلسرين أو اللاكتوفينول فلا توضع الشرائح بالفرن .

١٠ . دراسات تشريحية خاصة
Special anatomical Studies

يتناول الجزء التالى عـرضاً لبعض الطرق المتبعة فى دراسات معيـنة تختص بموضوعات محددة مثل :

أولاً : تفكيك نسيج الخشب Maceration of wood

تفكيك الأنسجـة طريقة كيميائية لفصـل الوحدات التى تتكون منها الأنسـجة النباتية ، وذلك بإذابة المادة الـلاحمة بين الخلايا ، والهدف مـن تفكيك أى نسيج هـو تكوين صورة دقيقة ثلاثية الأبعاد لطرز الخلايا المكونة للنسيج . ويتم ذلك بالطريقة التالية :

(١) تقطع العينة الخشـبية باستعمال شفرة حادة إلى أجزاء صغيرة علـى هيئة شظايا لا يزيد حجمها عن تلك المستخدمة فى تنظيف الأسنان Toothpick .

(٢) توضع شـظايا الخشـب فى وعاء زجاجى لـه غطاء زجاجـى به محلول إمـيج لتفـكيك الأنسجة Emig's macerating fluid ويتركب من :

١٠ جم	ثلاثى أكسيد الكروميوم	Chromium trioxide (CrO_3)
٩٠ مل	ماء مقطر	Distilled water
١٠ مل	حامض نيتريك	Nitric acid (HNO_3)

(٣) يوضع الوعاء المحتوى على العـينة والمحلول داخل فرن درجة حرارته ٥٠° م حتى تأخذ العينة شكلاً مفككاً Fuzzy ويتطلب ذلك نحو ساعتين .

(٤) يسكب الحامض بعيداً عـن العينة وتغسل الألياف جيداً بماء الصنبـور ، ثم تخلط العينة بكمية من الماء ويغـلق الوعاء بإحكام ، يرج الوعاء جيداً لفصـل الخلايا عن بعضها ، إذا لم تنفصل الخلايا بسهولة يخلط مع العينة كريات من الزجاج للمساعدة على تفكيك الخلايا .

(٥) تغسل الألياف بعناية عـدة مرات لفترة نحو ٢٤ ساعة بماء الصـنبور ، مع الإحتراس من فقد الخلايا الصغيرة بـعد تفكيكها . قد يعرض البعض المحلول لـعملية الطرد المركزى حتى يسهل الحفاظ على الخلايا المفككة .

الصبغ Staining

(١) تدرج بالمحلول مـن الماء حتى يصـل إلى كـحـول إيثايل ٥٠ ٪ خـلال عملية Dehydration لفترة ٥ دقائق بكل تركيز .

(٢) تجهز صبغة سفرانين كما يلى :

سفرانين	١ جم
كحول إيثايل ٩٥ ٪	١٠٠ مل

تخفف عند الاستعمال بماء مقطر بنسبة ١ : ١ .

(٣) تترك العينة فى صبغة السفرانين لمدة ساعة .

(٤) تشطف العينة سريعاً فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ .

(٥) تمرر العينة فى كحول إيثايل ١٠٠ ٪ (مطلق) لمدة دقيقة ، مرتين .

(٦) تمرر العينة فى كحول مطلق + زيلول (بنسبة ١ : ١) لمدة ٢ دقيقة .

(٧) تمرر العينة فى زيلول نقى I لمدة ٥ دقائق .

(٨) تمرر العينة فى زيلول نقى II لمدة ٥ دقائق .

(٩) توضع نقـطة من كندا بلسـم على شريحة - تؤخذ حـزمة صغيرة من الأليـاف بواسطة الملقط وتوضع فوق الكندا بلسم مع توزيعها حتى لا تبدو تحت المجهر متزاحمة ، تغطى بغطاء شريحة برفق ، وتجفف الشريحة .

ثانياً : دهك الأنسجة (طريقة الأسيتوكارمين)Smearing

تدهك الأنـسجة فى حـالة استعـمال الأسيتـوكارمين فى الـصبغ وهى طـريقة شائـعة الاستـعمال ، ويتـبع فى صبـغ الأنسجـة عدة صبغـات ولكن أكـثرها شيـوعاً هى طريـقة

الأسيتوكارمين وهى طريقة سريعة ؛ إذ يتم فيها القتل والتثبيت وصبغ الأنسجة المعاملة دفعة واحدة . وتستعمل التحضيرات الحديثة لعد الكروموسومات وارتباط بعضها ببعض ودراسة تركيبها التفصيلى ، ويمكن تحويل الشرائح من الحالة المؤقتة إلى المستديمة لإمكان الرجوع إليها وقت الحاجة .

تحضير الصبغة

كارمين	١ جم
حامض خليك ٤٥ ٪	١٠٠ مل
خلات الحديد (محلول مائى مشبع)	٢ نقطة

يذاب الكارمين فى حامض الخليك المغلى على حمام مائى ثم يبرد المحلول ويروق . يضاف محلول خلات الحديد ويترك حوالى ١٢ ساعة ثم يرشح ويحفظ الناتج فى ثلاجة ، تحفظ كمية صغيرة فى زجاجة بقطارة فى المعمل للاستعمال اليومى . بعض المشتغلين يستغنون عن إضافة خلات الحديد بالتفاعل الذى يحدث بين إبرة التشريح وحامض الخليك الموجود فى الصبغة ، ولكن ذلك يحتاج إلى مران لضبط العملية لأن زيادة الحديد يعيق تمييز الكروموسومات بوضوح وقد يعطى رواسب سوداء على شكل حبيبات لذا يفضل إضافة خلات الحديد . وفى هذه الحالة تستعمل إبرة مطلاة بالنيكل أو الكروم أو إبرة زجاجية ذات سن مدبب مناسب رفيع .

وتجرى عملية الدهك إما فى المتك أو فى قمم الجذور . وفى حالة المتك تدهك المتك الغضة فى نقطة أو اثنتين من الصبغة ، وتدهك المتك الصغيرة كلها أما الكبيرة فتجزأ إلى قطع تدهك كل منها منفردة . تزال بعد ذلك الجدر والأنسجة غير المرغوبة ، وتجرى هذه العملية تحت البينوكلر ، عند ذلك يمكن تغطية النسيج المتبقى على الشريحة بغطاء الشريحة ويضغط عليه أو ينقر عليه برفق وذلك للحصول على طبقة رقيقة ، تمرر الشريحة بسرعة عدة مرات على لهب كحولى ويحترس من الغليان . يزال الزائد من الصبغة إن وجد ثم تغلق حافة القطاع بشمع البارافين أو شمع البارافين بالمستكة بنسبة ١ : ١ ، تختبر الشريحة بالمجهر ثم تحفظ الشرائح مفردة فى ثلاجة فيتحسن اللون بعد عدة أيام ويصل إلى كثافته القصوى ثم يأخذ فى التدهور تدريجياً بعد ذلك . ليس من الميسور الحصول على المتك

اللازمة فى أى وقت لذا يجب جمعها أثناء الموسم وقتلها فى محلول قتل مناسب ، ثم تحفظ فى ثلاجة على درجة الصفر لعدة أشهر تبعاً لحالة كل نبات . البعض يفضل نقل المتك إلى كحول ٧٠ ٪ بعد يوم أو يومين من القتل حتى يمكن حفظها لمدة طويلة فى الثلاجة .

في حالـة قمم الجذور يجب الـتركيز على الـطور الاستوائى ، وتـستجيب بعـض قمم الجذور لهذه العملية رغم كبرها وبذلك يمكن تحـضير شرائح جيدة كما فى حالة البصل مثلاً بينما يقاوم البعـض الآخر عملية الدهك رغم صغره كما فى الحندقوق . تقـتل القمم النامية للجذور فى محلول قتل مناسب ويحسن أخذ الجزء المرستيمى مع جزء من منطقة الاستطالة، وعند الدهك يفصل الجزء المـرستيمى لإجراء العملية فقط . تترك النـماذج فى محلول القتل لمدة يوم على الأقـل ثم تنقل من عمليـة القتل إلى الدهك مبـاشرة أو إلى كحول ٧٠ ٪ إن تطلب الأمـر الحفظ لمدة طويلة . بـعد إجراء الدهك واستبعـاد الأنسجة غير المرغـوب فيها والتغطية بالغطاء تسخن على لهب ضعيف ويضغط على الغطاء حتى يتم إنفصال الخلايا عن بعضها البعض وتصبح مسطحة تماماً . تميل أحيـاناً الكروموسومات إلى التجمع نتيجة عملية دهك قمم الجـذور ، ويتنافى هذا مع الـغرض من العملية ، ولـكن يمكن التغلـب على هذه الظاهرة بغمس الـقمم النامية للجذور فى محلـول مائى مشبع من Baradichlorobenzene لمدة ١-٤ ساعات ثم تقتل فى أى من محالـيل القتل . ولقد وُجد أن محلول ١ - ٣ ٪ من كحول الميثايل يؤدى إلـى نفس الغرض بدلاً من بارادای كلوروبنزين ويعـطى مجموعات من الكروموسومات متباعدة نوعاً ، كما يمكن تـسهيـل تفكك الخلايا عن بعضها البعض بتحليل الصفيحـة الوسطى تحليلاً مائياً بـاستعمال ٥ - ١٠ ٪ من حامض الأيدروكلـوريك (يخفف الحامض إما بـالماء أو فى ٧٠ ٪ كحول) . بـعد المعاملة بالحامض ٥-٣٠ دقيقة تعاد الجذور إلى المثبت ويغير مرة على الأقل (اقترح البعض استعمال الإنزيمات لإجراء هذه العملية) .

يمكن تحويل الشرائح المؤقـتة فى عملية الدهك إلى مستديمة وذلك بتـجفيفها من الماء ثم التحمـيل فى كندا بلســم أو أحد البيئات الأخرى . ويمـكن استعمال طريـقة سيرس Sers لسهولتها **وتتلخص فى الآتى :**

اغمس الـشريحة مقلـوبة وأسند أحد طرفـيها إلى قضـيب زجاجى فى طبـق بترى ، يحتـوى على حامض خلـيك وكحول بنـسبة ٥٠ ٪ لكل مـنهما ، وبذلـك ينفصـل غطاء الشريحة من تلقاء نفسه . أمرر الشريحة والغطاء فى المحاليل الآتية مع تركها ٢-٥ دقائق فى كل منها :

(١) كحول إيثايل + كحول ثلاثى البيوتايل .T.B.A بنسبة ١ : ١ .

(٢) .T.B.A نقى ، ثلاث تغييرات متتالية .

(٣) توضع الشريحة بحيث تكون الأنسجة لأعلى على ورقة الترشيح ، ثم توضع نقطة من البلسم بحيث يميل إلى السيولة أو أى بيئة تحميل أخرى على الأنسجة ، ثم أنزل الغطاء بعناية مع وضع ثقل مناسب عليه .

ثالثاً: الدراسة التشريحية للعقدة وعنق الورقة بواسطة القطاعات اليدوية

Free hand method for petiolar and nodal study

عند الرغبة فى عمل دراسة تشريحية مقارنة لمنطقة العقدة وقاعدة عنق الورقة ، ينصح بإتباع الطريقة التالية للحصول على قطاعات يدوية :

(١) تتطلب العينات المجففة المعاملة بالغليان حتى يتم تطريتها Hydrate ، أما العينات المحفوظة فى محاليل فليست فى حاجة لهذه الخطوة .

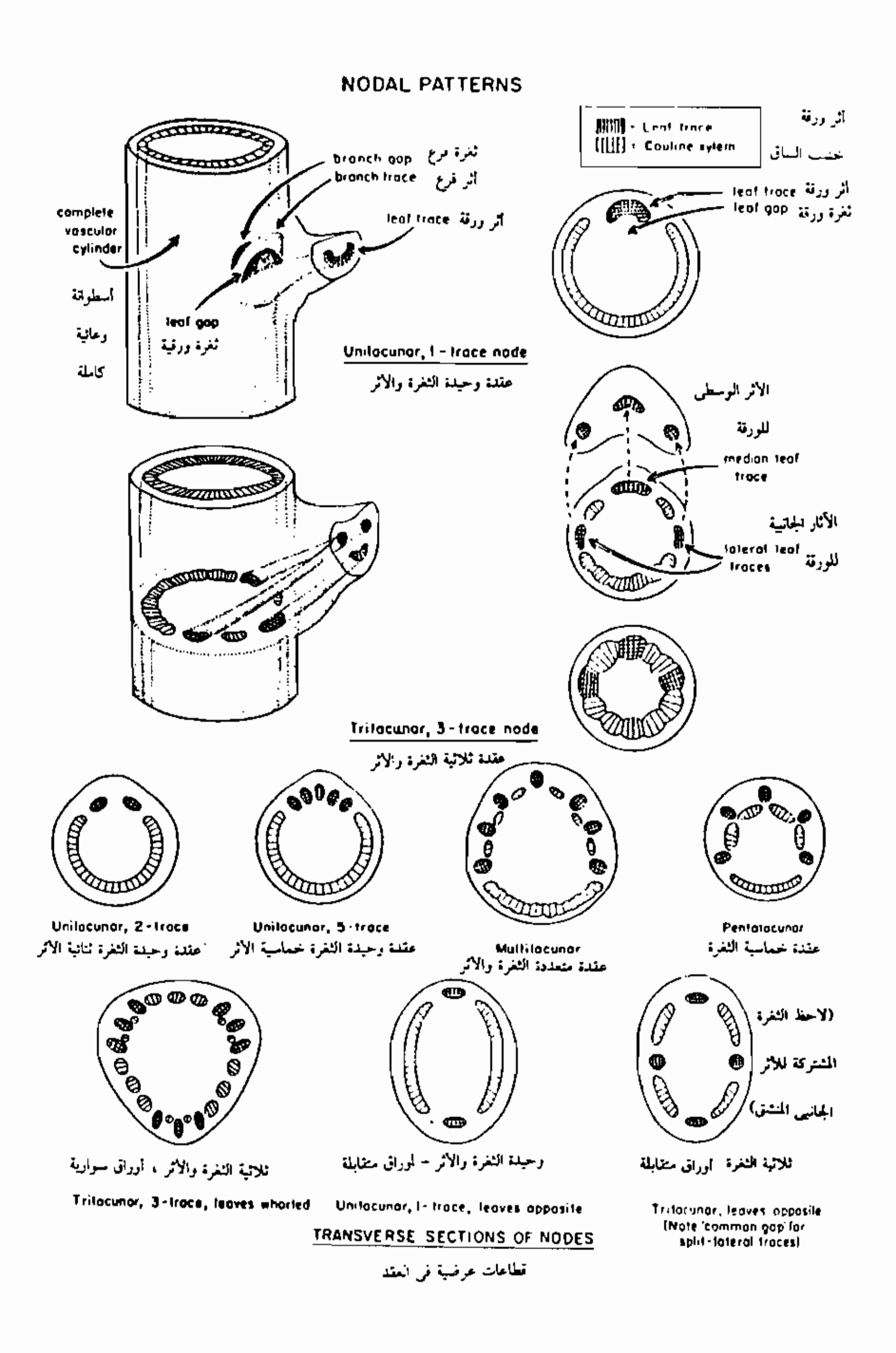
(٢) يجرى عمل قطاعات يدوية للمنطقة المطلوب فحصها باستعمال شفرة حادة ، مع الاستعانة بنخاع البيلسان أو جذر الجزر .

(٣) تستقبل القطاعات فى زجاجة ساعة بها محلول مائى مشبع من الفلورجلوسينول Phloroglucinol ، ويكفى لذلك بضعة دقائق ، حيث يستخدم هذا المحلول لإظهار الأنسجة الملجننة خاصة فى الدراسات التشريحية المقارنة ، كما فى حالة دراسة مسار الحزم الوعائية Vascularization فى عنق الورقة وتحديد طرز العقدة بالساق .

(٤) توضع القطاعات مباشرة على شريحة ، مع إضافة حامض الأيدروكلوريك Hydrochloric acid وغطاء شريحة ، تزال الزيادة من الحامض خارج غطاء الشريحة .

(٥) تفحص الشريحة تحت المجهر ، مع الحرص التام من ملامسة الحامض للمجهر .

(٦) تظهر الأنسجة فى الحال باللون الأحمر الأرجوانى Purple-red ، يجرى عمل رسم تخطيطى Sketch يوضح طراز الجهاز الوعائى ، يحلل الحامض الأنسجة سريعاً ، وتأخذ القطاعات لوناً باهتاً (شكل ١٠-١) .



شكل (١٠-١) : أنماط العقد (رادفورد Radford وآخرون ١٩٧٤).

رابعاً: الطرق المتبعة لدراسة تشريح الورقة والزهرة

Techniques employed in the study of leaf and flower anatomy

(أ) إزالة اللون Clearing

بالإضافة إلى الطرق المعتادة للتقطيع بالميكروتوم عند دراسة تشريح الأوراق والأزهار ، قد تستعمل طريقة إزالة اللون Clearing التى تفيد كثيراً فى دراسة مسار الأوعية Vasculation ، ويمكن إجراء هذه الطريقة مع العينات الغضة أو المحفوظة أو المجففة (المعشبية) ، وتجرى هذه العملية كما يلى :

(١) تؤخذ أجزاء نباتية صغيرة وتوضع فى طبق بترى (قد يتطلب الأمر كما فى حالة الأوراق تقطيع العينة إلى أجزاء مناسبة الحجم) ، لا تحتاج العينات المجففة أو المحفوظة فى محاليل أى معاملات خاصة قبل البدء فى العمل ، ومع ذلك تغلى العينات الغضة فى كحول أو توضع فى محلول كارنوى لفترة للتخلص من الكلوروفيل قبيل عملية إزالة اللون .

(٢) تغمس العينة النباتية فى محلول ٥ ٪ أيدروكسيدصوديوم (أو أيدروكسيدبوتاسيوم) وتوضع فى فرن على درجة حرارة ٣٧° م لمدة يوم إلى عدة أيام تبعاً لطبيعة الأنسجة .

(٣) عندما تصبح العينة شفافة (أو تقريباً كذلك) تغسل بقليل من الماء .

قد تحتوى بعض العينات النباتية على أصباغ داكنة مختلفة يفضل إزالتها فى هذه المرحلة بغمسها فى محلول التبييض Stockwell's Bleach .

ويتركب هذا المحلول من :

٩٠ مل ماء مقطر	Distilled water
١ جم بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate
١٠ مل حامض خليك ثلجى	Glacial acetic acid
١ جم حامض الكروميك	Chromic acid

تترك العينة داخل هذا المحلول لفترة ساعة إلى عدة ساعات على درجة حرارة الغرفة حتى تمام زوال جميع الصبغات ، بعد ذلك يسكب محلول التبييض وتغسل العينة جيداً .

(٤) قد يرى البعض عند هذه المرحـلة استعمال محلول Chloral hydrate مركز لاستكمال عملية إزالة اللون إن لم تصبح العينة شفافة تماماً ، وفى كثير من الحالات لا تكون هذه العملية ضرورية .

(٥) يبدأ بعد ذلك تجفيف العينة باستعمال كحول إيثايل ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ لمدة ٥ دقائق لكل منهما .

(٦) تجرى عملية الصبغ باستعمال السفرانين ١ ٪ فى كحول إيثايل ٥٠ ٪ ، ويكفى لذلك دقائق معدودات مع الرج برفق .

(٧) تستكمل عملية التـجفيف فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ و ٩٥ ٪ ، وهذه المحاليـل قد تزيل الصبغة لذلك يراعـى الحرص بعدم ترك العينات بها لفترة طـويلة ، وفى نفس الوقت يراعى تمام عملية التجفيف .

(٨) تمرر العينة على كحول مطلق لعدة دقائـق ، لا تحدث إزالة كبيرة للصبغة مع التركيزات العالية من الكحول .

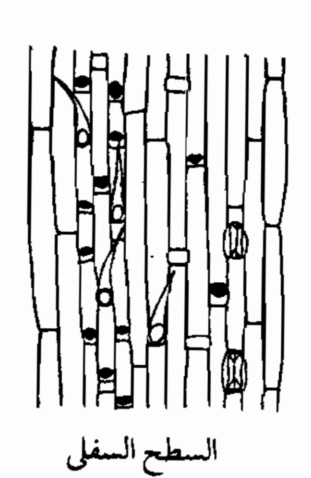
(٩) يستعمل بعد ذلك محلول من كحول مطلق وزيلول بنسبة ١ : ١ لعدة دقائق.

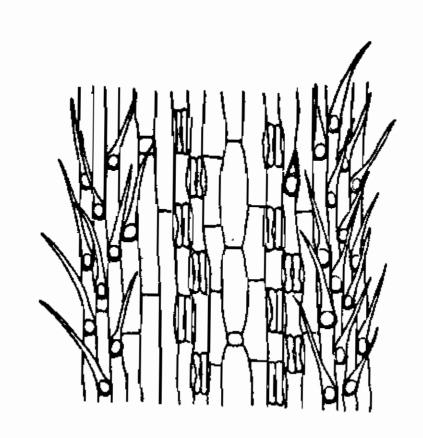
(١٠) يستعمل بعد ذلك زيلول نقى ، يدل تعكر الزيلول على عدم تمام التجفيف ، وفى هذه الحالة تعاد العينة إلى الكحول المطلق .

(١١) تجرى عملية التحمـيل فى الكندا بلـسم - أحياناً يفضل الاحتـفاظ بالأجزاء الزهرية فى أنبوبة لدراسة مسار الحزم الوعائية من جميع الأوجه .

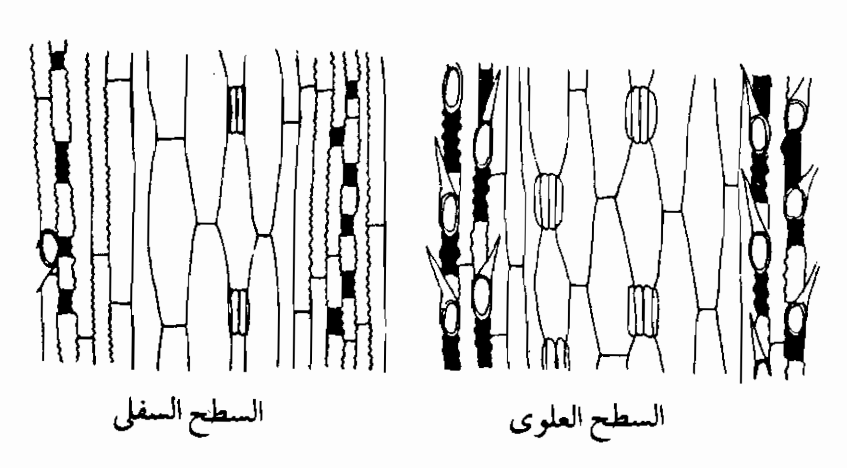
(ب) سلخ البشرة Epidermal peels

يمكن عمل سلخ فى ورقة غضة أو محفوظة باستعمال شفرة حادة ، وذلك بفصل الطبقة السطحية القريبة adaxial أو البعيدة abaxial ثم تحميلـها فى ماء على الشريحـة وفحصها تحت المجهر ، ولـما كان هذا التحضيـر من النوع المؤقت فمـن الأفضل عمل رسم تخـطيطى للبشرة باستخدام كاميرا لوسيدا Camera lucida كما فى شكل (١٠-٢) .





Vulpia alopecuros



Vulpiella tenuis

100 µm

شكل (١٠-٢) : البشرة لبعض النجيليات ، تظهر خلايا السيليكا باللون الأسود (ستاس Stace ١٩٨٤) .

خامساً: بعض الطرق المستعملة لتجهيز العينات التشريحية لأمراض النبات

(١) الفطريات البيضية Oomycetes

مثل جنس *Albugo* (شكل ١٠-٣) ، تنتخب بثرات حديثة غير متفجرة ، وتقتل وتثبت باستعمال محلول كراف Craf ويفضل الصبغ بواسطة Iron-Hemalum لإظهار نواة الفطر كما يمكن استعمال الهيماتوكسلين - سفرانين أو سفرانين - أخضر سريع .

فى حالة الجراثيم الجنسية Oospore تقتل وتثبت العينات بواسطة محلول F.A.A. ، وتتبع طرق الصبغ العامة .

تتبع الطرق السابقة الذكر أيضاً مع أمراض البياض الزغبى المسببة عن الجنس *Peronospora* والندوة المتأخرة فى الطماطم والبطاطس المسببة عن الجنس *Phytophthora* (شكل ١٠ - ٣) .

قد تتبع الطريقة التالية لصبغ القطاعات باللاكتوفينول الأخضر لإظهار الصبغات فى الأنسجة المصابة :

(١) توضع العينة فى لاكتوفينول مخفف (جزء لاكتوفينول + ٢ جزء ماء مقطر) لمدة ١٠ دقائق .

(٢) يستبدل اللاكتوفينول المخفف بمحلول لاكتوفينول أخضر قوى (١ر٠ ٪) . يترك لليوم التالى معرضاً للهواء .

(٣) تغسل العينة فى لاكتوفينول رائق لإزالة الصبغة الزائدة ، حتى يصير لون الصبغات واضحاً ومحدداً .

(٤) تحمل العينة فى لاكتوفينول ، أو صمغ اللاكتوفينول وتركيبه كالتالى:

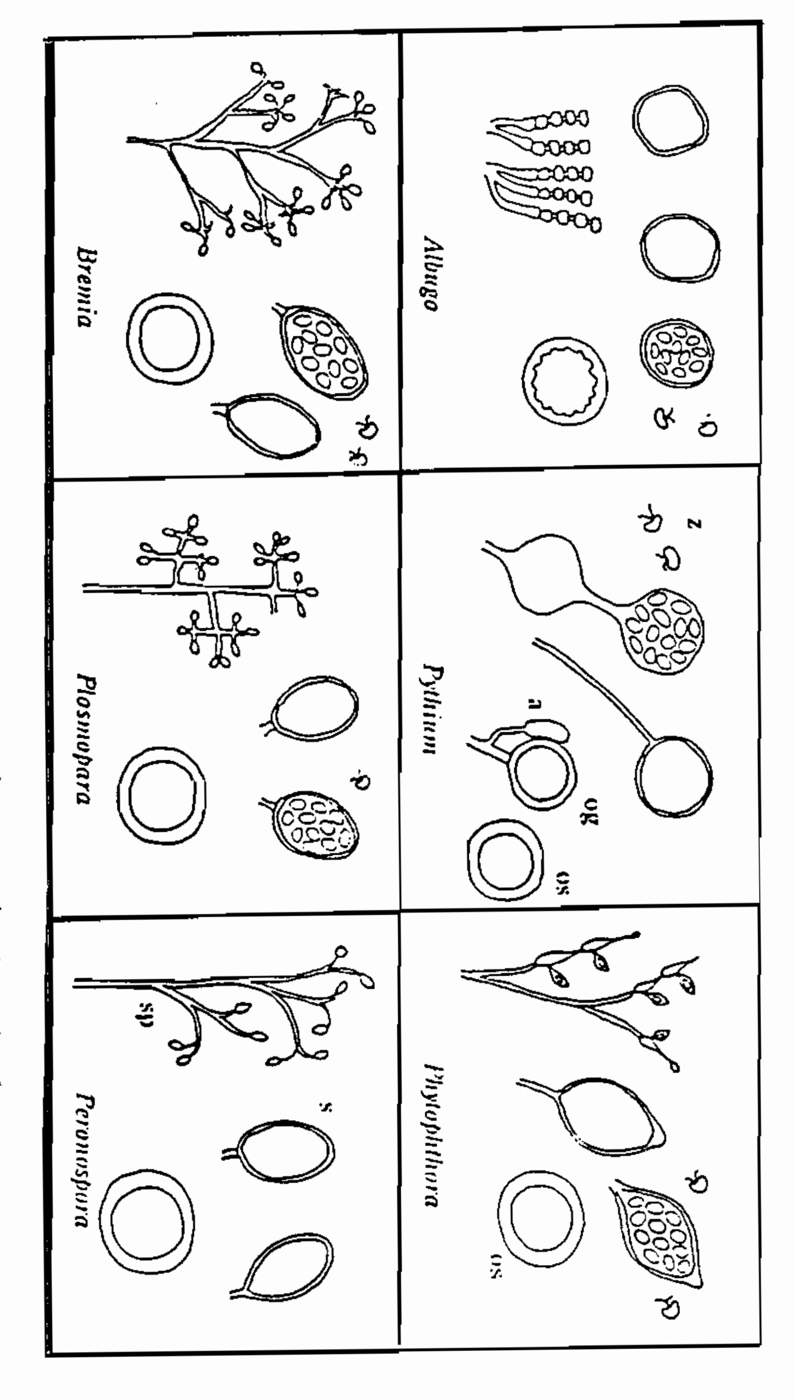
يذاب ٣٨ جم من الصمغ العربى النقى فى ٥٠ مل ماء مقطر

يضاف ٥ جم جلوكوز و ٦ جم لاكتوفينول

يرشح المحلول فى موسلين

يستعمل هذا الصمغ بارداً ويجف سريعاً .

ويقترح البعض صبغ البياض الزغبى بواسطة اللاكتوفينول - النيجروسين ؛ حيث تظهر الأنسجة المصابة بجلاء فضلاً عن أنه يظهر النوايات واضحة .



شكل (١٠-٣) : أمثلة لبعض أجناس الفطريات البيضية Oomycetes .

يضاف ١ - ٥ مل من محلول مائى للنيجروسين إلى ١٠٠ مل لاكتوفينول . يمكن استعمال غروى الجلسرين للتحميل بدلاً من اللاكتوفينول .

برشمة التحضير :

عند استعمال بيئة تحميل معرضة للجفاف مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين يلزم برشمة التحضير بوضع مادة صمغية مثل الكندا بلسم أو الأسفلتم أو غيرهما حول حافة الغطاء لمنع تبخر البيئة وجفافها وبالتالى يمكن حفظ التحضير فى حالة جيدة لفترة زمنية طويلة .

من الصعوبات التى قد تواجه برشمة التحضير تسريب المادة الصمغية أسفل الغطاء مما يؤدى إلى تلف التحضير خاصة إذا كانت البيئة سائلة مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين، وللتغلب على ذلك يراعى قبل إجراء عملية البرشمة إزالة الزائد من بيئة التحميل ووضع الشريحة فى مجفف لعدة أيام حتى يزداد سمك قوام البيئة ثم تطوق حافات الغطاء بطبقة رقيقة جداً من غروى الجلسرين الساخن بفرشة وتترك لتتماسك تماماً ثم تجرى عملية البرشمة بعد ذلك ، يعيق غروى الجلسرين نتيجة تماسكه تسرب المادة الصمغية أسفل الغطاء، وإذا فرض وتسرب شيء من الغروى فإنه يختلط باللاكتوفينول أو غروى الجلسرين اختلاطًا تاماً فلا يكون له أثر يذكر .

(أ) طريقة التطويق :

يستعمل فى ذلك الآلة الدوارة وفرشاة صغيرة ومحلول من المادة المستعملة متوسطة القوام، وتتبع الخطوات التالية :

(١) يزال الزائد من بيئة التحميل ، وينظف حول الغطاء جيداً ، تستعمل أغطية شرائح مستديرة .

(٢) تلمس حافة الغطاء فى ثلاث أو أربع نقاط متفرقة ليتماسك الغطاء ولا يتحرك أثناء التطويق .

(٣) تثبت الشريحة على المائدة الدوارة وتنظم ليكون الغطاء فى وضع متوسط مناسب فوق الدائرة التى تتمشى مع محيطه .

(٤) تغمس الفرشاة فى المحلول ، ويؤخذ بها كمية مناسبة حتى لا تسيل على الشريحة أثناء التطويق وتفسد العملية ، يرتكز باليد على اللوحة الثابتة وتدار المائدة بسرعة وأثناء

الدوران يراعى أن يلمس طرف الفرشاة حافة الغطـاء من خارجه قليلاً ثم تحريكها برفق إلى الداخل حتى تـغطى حافة الغطـاء لمسافة ١ مم تقـريباً إلى الداخل وبذلـك تتكون حلقة رقيقة منتظمة حول حافة الغطاء ، تترك لتجف وتعاد الكرّة مرة أو اثنتين حتى يتم وضع كمية كافـية حول الحافة ولا توضع طبقة إلا بـعد تمام جفاف الطبقة السـابقة لها تماماً .

ويفضل عمـل الطوق من طبقتين رقيقـتين أو ثلاث بدلاً من طبقة واحدة سمـيكة حتى لاتكون عرضة للتشقق فيجف التحضير ويتـلف ، وإذا كان الغطاء مربعاً أو مستطيلاً فيمكن عمل التطويق باليد لكنه يكون غير منتظم فى سمكه وشكله .

ويمكن استعمال الخليط التالى فى برشمة الأغطية :

فازلين ٥٠ ٪ + شمع البارافين ٥٠ ٪ (درجة انصهاره ٥٨-٦٠° م) .

وتستعمل هذه الطريـقة إذا كان الهدف المحافظة على التحضيرات لفـترة ليست طويلة ، ويمكن زيادة الفترة بطلائها بعد ذلك بطبقة من الكندا بلسم زيادة فى الصيانة .

من مميـزات هذا الخليـط أنه لا يتسرب تحـت الأغطية ويـتماسك بسـرعة عندمـا يبرد ولايجف للدرجة التى تعرضه للتشقق وفوق ذلك يمكن تنظيف الشرائح والأغطية بسهولة عند الاستغناء عن التحضيرات بوضعها فى ماء ساخن فينصهر الخليط ويطفو على السطح وبذلك يمكن إزالته وتنظيف الشرائح والأغطية بعد ذلك بإحدى الطرق المعروفة .

(ب) طريقة ديهل Diehl

تستعمل هذه الطريقة فى حالة التحضيرات المطلوب حفظها لسنين عديدة، وهى كالتالى:

(١) توضع نقطة مـن بيئة التحميل اللاكتـوفينول أو غروى الجلسرين فى وسـط غطاء كبير (قطره ٢٢ مم) .

(٢) توضع العينة فى البيئة وتنظم بإبرتـين نظيفتين ، ثم تغطى بغطاء أصغر (قطره ١٢-١٤ مم) ، يوضع الغطاء الصغير فى موضع متوسط من الغطاء الكبير .

(٣) يزال الزائد من البيئة بورقة ترشيح ، ثم توضع كـمية مناسبة من الكندا بلسم فى وسط الغطاء الصغير .

(٤) توضع الشريحة برفق على التحضير حتى تغطى الكندا بلسم العينة والغطاء الصغير وتنتشر فتملأ الجزء الخالى من الغطاء الكبير ، يستحسن أن تكون الكندا بلسم سميكة القوام نوعاً حتى لا تميل للتسرب تحت الغطاء الصغير والاختلاط بالبيئة ، تسخن الشريحة قليلاً حتى يساعد ذلك على انتشار الكندا بلسم .

(٥) تقلب الشريحة بعد ذلك ، فيكون التحضير فى وضعه النهائى ، وتوجد العينة ما بين الغطائين ، محفوظاً من الجفاف مبرشماً بطبقة الكندا بلسم التى انتشرت وملأت الفراغ حول الغطاء الصغير إلى حافة الغطاء الكبير .

رغم الاحتياطات قد تميل الكندا بلسم إلى التسرب تحت الغطاء ، يمكن تجنب ذلك بطلاء حافة الغطاء الصغير بطبقة رقيقة من غروى الجلسرين ثم إضافة الكندا بلسم بعد تماسك غروى الجلسرين .

الصبغ المستديم :

يمكن استعمال طريقة الصبغ المزدوج ، ولا تختلف خطوات الصبغ بهذه الطرق المختلفة عما هو متبع فى التكنيك النباتى العام ، كما توجد طرق خاصة لصبغ الأنسجة المصابة وإظهار الميسليوم فى أنسجة العائل مثل :

(ا) بيانيز III ب :

تحضر هذه الصبغة كما يلى :

أخضر الملاكيت	٥٠ر٠ جم
فوكسين حمضى	١٠ر٠ جم
أصفر مارشياس	٠١ر٠ جم
ماء مقطر	١٥٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٥٠ مل

خطوات الصبغ :

(١) تغسل القطاعات بعد القتل والتثبيت فى ماء أو كحول ٥٠ ٪ .

(٢) تصبغ القطاعات فى بيانيز III ب لمدة ١٥-٤٥ دقيقة .

(٣) تغسل القطاعات فى ماء أو كحول ٥٠ ٪ ثم تدرج حتى كحول ٩٥ ٪ حامضى (كحول إيثايل ٩٥ ٪ مضافاً إليه بضع نقط من حامض الأيدروكلوريك) .

(٤) تروق القطاعات فى تربنتين فينولى (٢ جزء فينول بللورات منصهرة+ ٣ أجزاء تربنتينا).

(٥) تغسل القطاعات فى زيلول وتحمل فى الكندا بلسم .

تصبغ أنسجة العائل باللون الأخضر وميسليوم الطفيل باللون القرنفلى الغامق .

(ب) أحمر المجدالا - الأخضر الضوئى Megdala red-Light green

(١) بعد القتل والتثبيت تغسل القطاعات فى الماء .

(٢) تصبغ القطاعات فى محلول حديث من أحمر المجدالا ٢٥ر٠ ٪ فى ماء الصنبور لمدة دقيقة إلى ٢٤ ساعة ، تتوقف مدة الصبغ على قابلية ميسليوم الطفيل لتشرب الصبغة ، ويمكن تقليل المدة بزيادة قوة الصبغة .

(٣) تزال الزيادة من الصبغة بتعريض القطاعات لمدة ٥ دقائق لماء الصنبور .

(٤) تجفف القطاعات حتى الكحول المطلق لمدة ٣٠ ثانية .

(٥) تنقل القطاعات إلى الأخضر الضوئى قوة ٣ر ٪ فى زيت القرنفل وتفحص تحت المجهر للتأكد من تمام الصبغ .

(٦) توضع القطاعات فى زيت القرنفل لمدة ٥ دقائق أو أكثر لإزالة الزائد من الأخضر الضوئى تماماً .

(٧) تغمس القطاعات فى الزيلول وتحمل فى الكندا بلسم .

تأخذ أنسجة العائل اللون الأخضر وهيفات الطفيل اللون الأحمر .

جـ - مخلوط السفرانين وازرق القطن فى اللاكتوفينول الكحولى :

ويستعمل لصبغ فطريات Peronosporaceae كالبياض الزغبى فى العنب .

المحلول الأول : (اللاكتوفينول الكحولى)

فينول	١٠ جم
حامض لاكتيك مركز	١٠ مل

جلسرين	٢٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٢٠ مل

المحلول الثانى : (مخلوط الصبغة)

أزرق القطن	٠٢ر٠ جم
سفرانين	٠١ر٠ جم
لاكتوفينول كحولى (المحلول الأول)	١٠٠ مل

قطاعات البارافين :

(١) يزال الشمع ويجرى التدرج بالقطاعات حتى كحول ٩٥ ٪ .

(٢) توضع فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) لمدة ١٠-١٥ دقيقة .

(٣) تصبغ فى مخلوط الصبغة (المحلول الثانى) لمدة ساعتين أو أكثر ، وتحرك الشرائح أثناء ذلك على فترات لضمان انتشار الصبغة فى الأنسجة بتساوٍ وانتظام .

(٤) توضع القطاعات فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) حتى يزول الزائد من الصبغة وتفحص القطاعات بالمجهر لتحديد درجة الصبغ مع مراعاة أن تكون أغمق نوعاً من الدرجة المطلوبة ، ثم تغسل فى كحول مطلق .

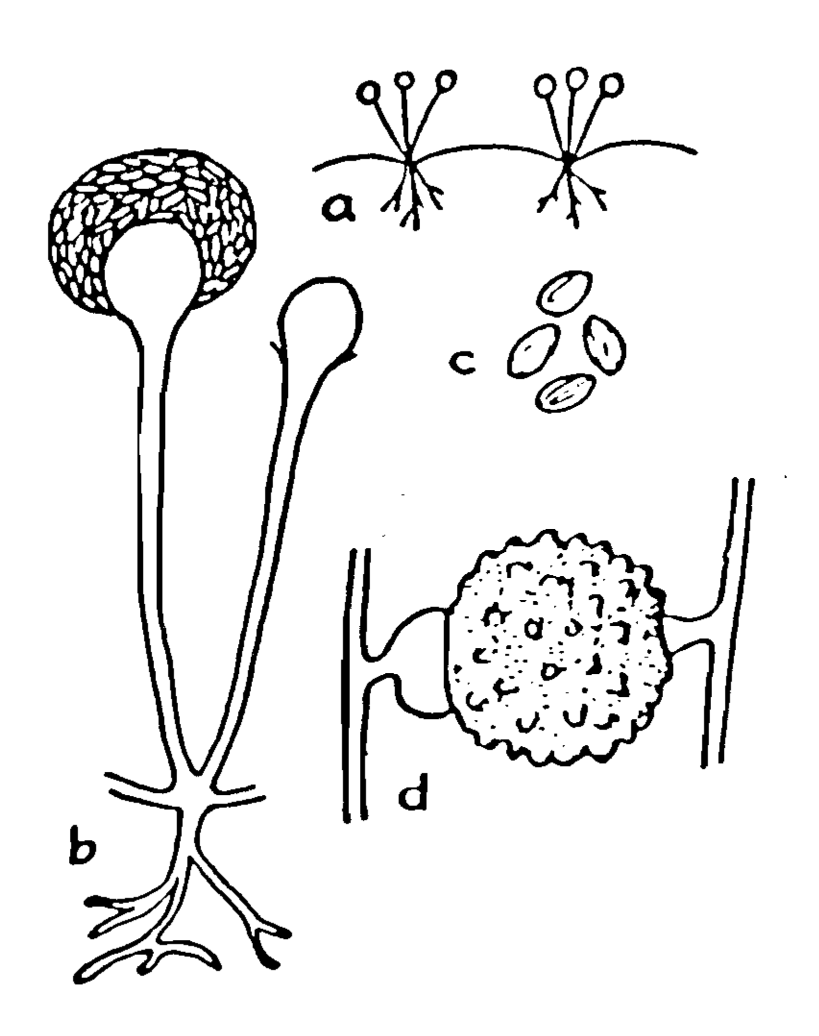
(٥) تصبغ القطاعات فى محلول ضعيف من السفرانين فى زيت القرنفل ٥ر٠ ٪ لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة حتى يصبح لون أنسجة العائل أحمر غامقًا .

(٦) توضع بعد ذلك فى زيت القرنفل لتحدد الصبغة بالدرجة المطلوبة ، ويتم ذلك بالفحص المجهرى .

(٧) تغسل فى الزيلول وتحمل فى الكندا بلسم ، مع مراعاة تمام التخلص من زيت القرنفل . يصبغ الميسليوم باللون الأزرق وأنسجة العائل باللون الأحمر .

(٢) الفطريات الزيجية (اللاقحية) Zygomycetes

مثل فطريات *Rhizopus* (شكل ١٠-٤) و *Mucor* ويتم دراستها من التحميل الكامل للفطر وغالباً ما يستعمل لهذا الغرض اللاكتوفينول سواء الرائق أو الملون وذلك بقتل وترويق



(a) طبيعة النمو (b) حوامل إسبورانجية

(C) جراثيم اسبورانجية (d) جرثومة زيجية

شكل (١٠-٤) : فطر الريزوبس *Rhizopus* من الفطريات الزيجية Zygomycetes .

(جيلمان Gil man ١٩٥٧)

وصبغ الهيفات إذا كانت غير ملونة ، ويستعمل فى تلوين اللاكتوفينول الصبغات التالية :
Cotton blue (وقد تسمى Soluble blue) أو Methyl blue أو Aniline blue .

كما قد يستعمل اللاكتوفينول المضاف إليه الفوكسين الحمضى أو الأخضر الحمضى ، وذلك بإضافة ١-٥ مل من محلول مائى للصبغة لكل ١٠٠ مل من اللاكتوفينول .

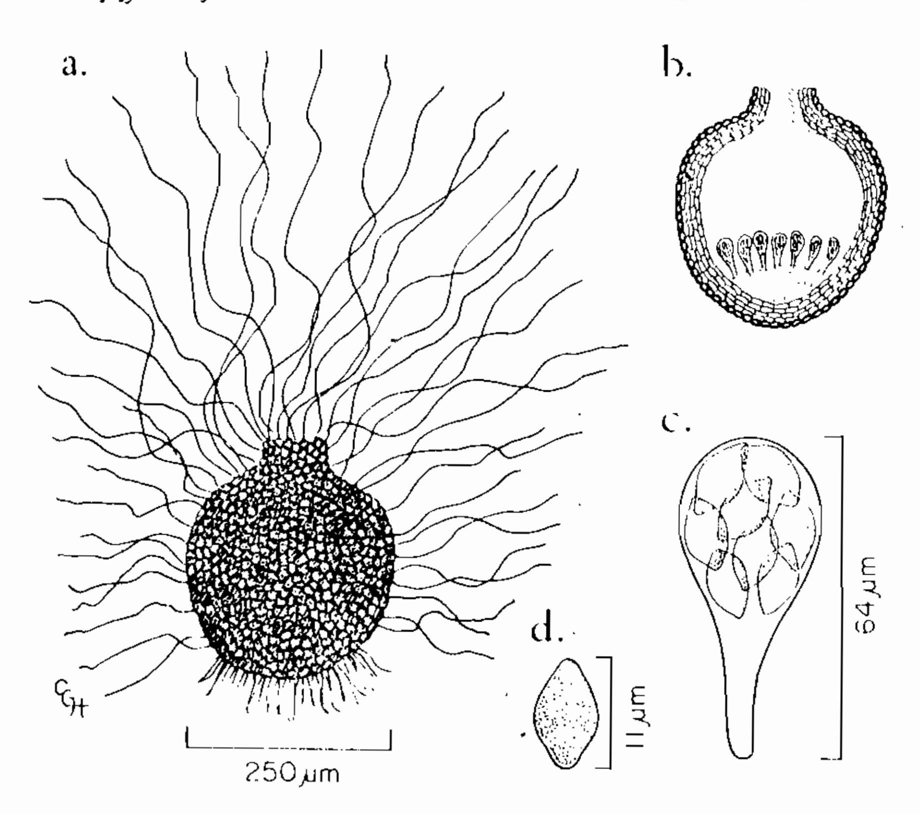
أما فى حالة الجراثيم الزيجية فيمكن حفظها بقطع الأجزاء المحتوية عليها من مزرعة الآجار وقتلها فى محلول F.A.A. وبذلك يمكن استعمالها لدراسة الطلبة محملة فى الماء أو اللاكتوفينول أو عمل شرائح مستديمة (تعمل الشرائح المستديمة بطريقة Butyl Alcohol-Resin أو بطريقة Dioxan-Balsam) .

(٣) الفطريات الأسكية (الزقية) Ascomycetes

تنمو الفطريات المسببة لأمراض العفن التابعة لهذه المجموعة مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Chaetomium* (شكل ١٠-٥) نمواً جيداً على البيئات الصناعية وبذلك يمكن دراستها بعمل تحميل كامل فى الماء أو فى اللاكتوفينول أو فى غروى الجلسرين كما سبق الذكر مع فطر *Rhizopus* وغيره ثم تجرى برشمة للتحضيرات إذا كان مطلوباً حفظها بصورة مستديمة .

أما فى حالة أمراض البياض الدقيقى Erysiphales فيمكن دراستها بعمل كشط أو سلخ والتحميل فى اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين ، أما فى حالة دراسة الممصات وتفرعها داخل خلايا البشرة فيمكن قتل وتثبيت الأجزاء المختارة من الأوراق فى محلول Craf وصبغها بعد ذلك بواسطة Iron Hematoxylin .

أما الأكياس الناتجة من التكاثر الجنسى فتقتل فى محلول Bouin أو Craf ثم تصبغ باستعمال Iron Hematoxylin أو بالسفرانين - أخضر سريع .



(a) منظر عام لثمرة أسكية قارورية Perithecium

(b) قطاع خلال الثمرة الأسكية القارورية ، يوضح مجموعة الأكياس الأسكية بالجزء القاعدى المنتفخ من القارورة .

(C) كيس أسكى يشتمل على جراثيم أسكية

(d) جرثومة أسكية ناضجة

شكل (١٠-٥) : فطر *Chaetomium globosum* . من الفطريات الأسكية Ascomycetes

(هانلن Hanlin ١٩٩٠)

(٤) الفطريات البازيدية (الهراوية) Basidiomyectes

(أ) أمراض التفحم Ustilaginales

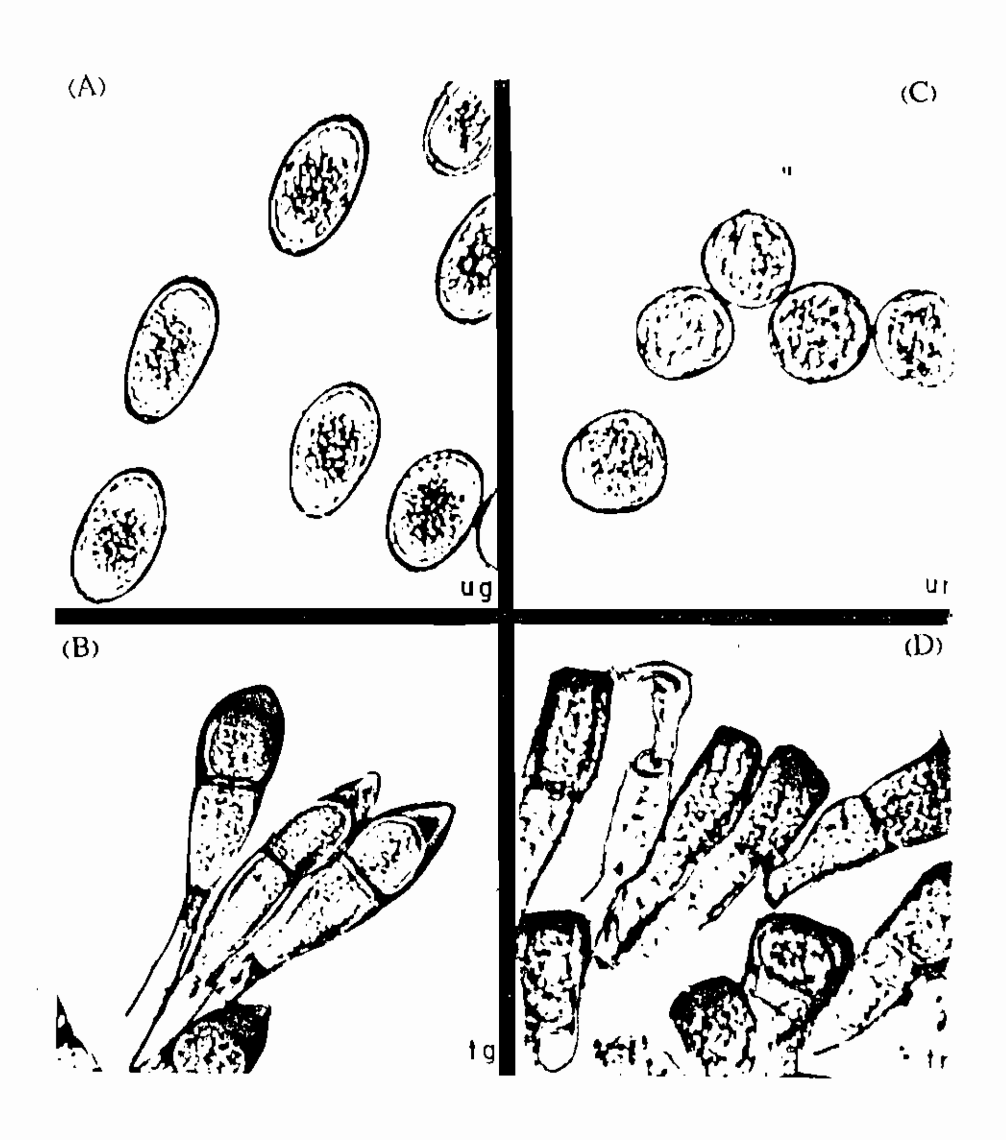
تُنتقى الـبثرات حديثة الـعمر بما حولها مـن أنسجة العائل وتـقتل وتثبت فـى محلول Craf، أما البثرات الكبيرة فيستخدم معها محلول .F.A.A .

أما الجراثيم الكلاميدية والميسليوم الأول Promycelium و Sporidia فيمكن دراستها فى تحميـل سائل بعد نقلهـا من الحقل ويمكن تحويل الـشرائح من الحالة المؤقتـة إلى الحالة المستديمة بالطرق سابقة الذكر .

(ب) الأصداء Uredinales

وهى فطـريات واسعة الانـتشار خاصـة على القـمح ، تُنتقـى البثرات الحـديثة العـمر للجراثيم اليوريدية Urediniospores والتيليتية Teliospores (شكل ١٠-٦) والأفضل أن تكون على الأوراق (وليس الساق) وتقتل فى محلول .F.A.A وتستكمل الخطوات كما سبق الذكر .

ويستعمل محلول .F.A.A أو Craf لقتل وتثبيـت الطورين الأسيدى Aeciospores والبكنيدى Pycnidium ثم الصبـغ باستـعمال الســفرانين - أخضر سريـع ، والأفضل Iron Hematoxylin وتتبع نفس الطرق مع الأصداء الأخرى .



(A) جراثيم يوريدية .

(B) جراثيم تيليتية لفطر *Puccinia graminis f. sp. tritici*

(C) جراثيم يوريدية .

(D) جراثيم تيليتية لفطر *Puccinia Striiformis*

شكل (١٠-٦) : أمثلة لبعض أجناس الفطريات البازيدية Basidiomycetes

(ويز Wiese ١٩٧٧)

(٥) الفطريات الناقصة Deuteromycetes

وتضم مجموعـة من الفطريات لم يكتشـف للآن الطور الجنسى لها وهى مـجموعة من الفطريات غير متجانسة يتكـون فيها الميـسليوم مـن هيفات مقسـمة مثل الجنس *Sclerotium* و *Rhizoctonia* (شكل ١٠ - ٧) يسـتعمل لقتل وتثـبيت هذه الفطريـات محلول Craf وتصبغ باستعمال Iron Hematoxylin ويراعى أن تكون الصبغة كثـيفة ثم تخفف بمحلول حامضى خفيف مـن حامض الأيدروكلوريك ، وفى حالة وجود الهيـفات فى أوعية الخشب فيفضل قتلها فى محلول .F.A.A ، وتصبغ بالطريقة التالية :

أزرق القطن - سفرانين Cotton blue-Safranin

(١) تغسل القطاعات فى الماء .

(٢) تصبغ فـى محلول ٥ر٠ ٪ أزرق القطن فـى لاكتـوفينول لمدة ٥-١٥ دقيقة مـع التسخين الهين (يمكـن فى حـالة القطـاعات الملصوقة علـى الشريحة وضع إناء الصـبغ فى فرن الشمع) .

(٣) يزال الزائد من الصبغة بواسطة لاكتوفينول رائق .

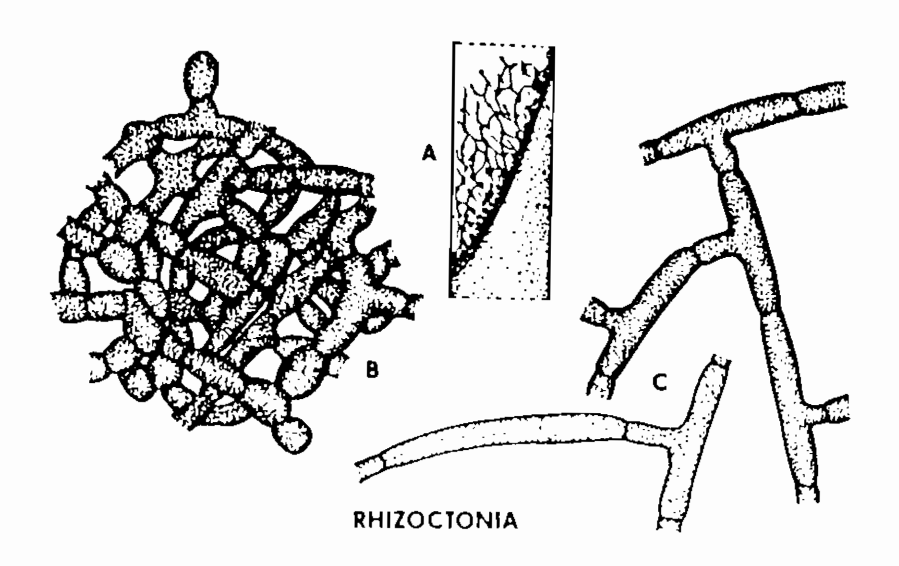
(٤) تغسل فى كحول ٧٠ ٪ لإزالة اللاكتوفينول .

(٥) تصبغ فى سفرانين لمدة ١٠ دقائق (١ ٪ فى كحول ٥٠ ٪) .

(٦) تغسل فى كحول ٧٠ ٪ لإزالة الصبغة الزائدة ثم تنقل إلى كحول ٩٥ ٪ ثم إلى كحول مطلق .

(٧) تروق فى زيلول وتحمَّل فى كندا بلسم .

تأخذ الصبغات لونًا أزرق حادًا والأنسجة الخشبية لونًا أحمر .



(A) أجسام حجرية صغيرة وميسليوم (مزرعة) ٠

(B) قطاع في جسم حجرى ٠

(C) خلايا الميسليوم ٠

شكل (١٠ ٧) : فطر ريزوكتنيا .*Rhizoctonia* DC

من الفطريات الناقصة Deuteromycetes .

(بارنت وهنتر Barnett & Hunter ١٩٨٧)

١١ . المجهر
Microscope

عقب إكتشاف شلايدن Schleiden وشفان Schwann وفيرشو Virchow في النصف الأول من القرن التاسع عشر نظرية الخلية Cell theory ، والتي مفادها أن الخلية هي الوحدة الأساسية في تركيب الكائنات الحية بمختلف صورها شهد العالم تطورًا هائلاً في معرفتنا عن الخلايا، ويرجع ذلك أساسًا للتقدم الملموس في صناعة البصريات وبالتالي المجهر .

يعتمد الفحص التفصيلي الدقيق لتركيب الخلايا على ثلاثة أسس رئيسية :

(١) التكبير Magnification ويعتبر وسيلة لزيادة الحجم الظاهري للشيء المراد فحصه حتى يمكن رؤيته .

(٢) التمييز (الإظهار) Resolution وهو القدرة على فصل الأشياء المتقاربة عن بعضها البعض .

(٣) الاختلاف (التقابل) Contrast ويقصد به إمكانية تحديد جزء ما عن آخر .

على الرغم أن للمجهر الضوئي قوة تكبير عالية نسبيًا تصل إلى نحو ٥٠٠ ضعف الحجم الطبيعي، إلا أن قوة التمييز له محدودة، وغير كافية لفحص بعض التراكيب الدقيقة بالخلية. ولتحقيق الاختلاف بالعينة التي تفحص مجهريًا يتم تثبيتها وصبغها، حيث تختلف قابلية أجزاء العينة للصبغات وبالتالي يمكن إكساب الأجزاء المختلفة للعينة ألوانًا متباينة يسهل معها التفرقة فيما بينها .

ولقد فتح اختراع المجهر الإلكتروني أفاقًا رحبة لدراسة الخلايا ، وكما يدل الاسم يستخدم في هذه الحالة حزمة إلكترونية بدلاً من الضوء المستخدم مع المجهر الضوئي، تمر الإلكترونات خلال العينة ثم تسقط على لوحة فوتوغرافية وتعطي صورة للعينة - يصل التكبير بالمجهر الالكتروني إلى نحو مليون ضعف الحجم الطبيعي .

يتناول الجزء التالي شرحًا مبسطًا لأساسيات الفحص المجهري، ثم المجهر بأنواعه المختلفة البسيط والضوئي والإلكتروني، وكذلك فائدة وكيفية استخدام كل منها .

أساسيات الفحص المجهرى

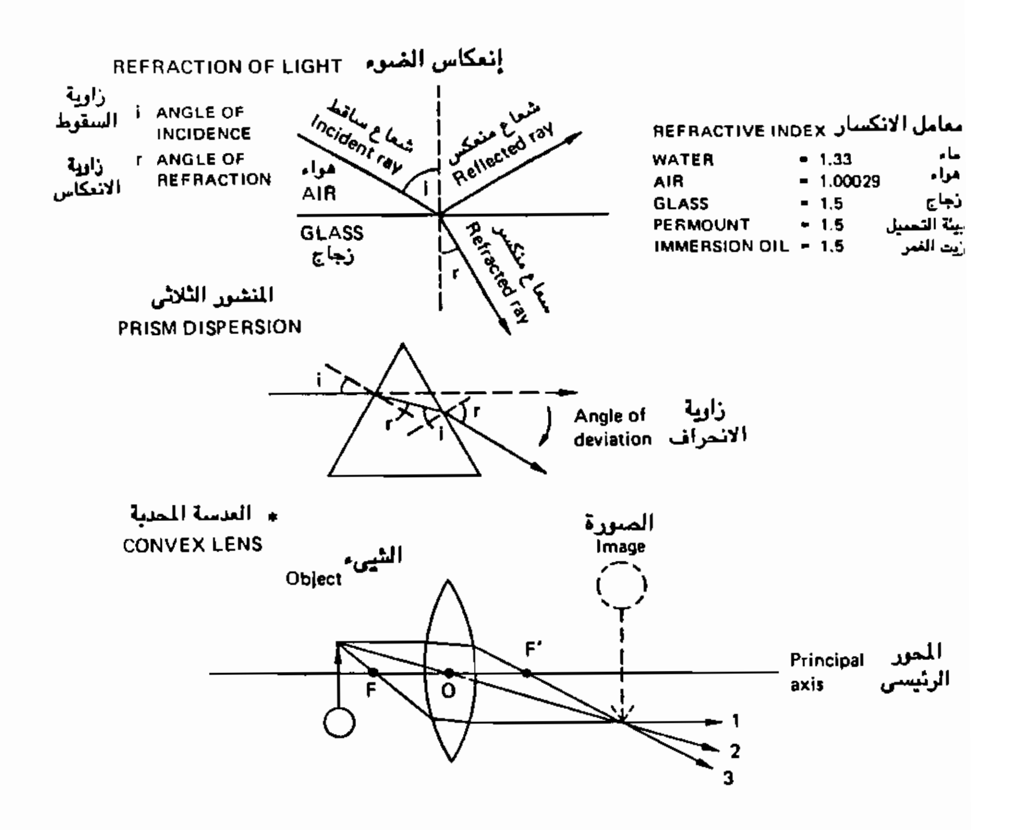
البصريات Optics

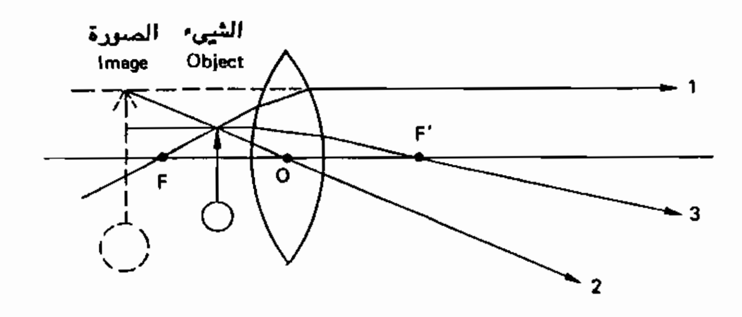
يتركب الضـوء من موجات كهرومغنـاطيسية Electromagnetic waves ذات أبعاد محددة تتحرك فـى خط مستقيم وتـنكسر على هيئـة زاوية (شكل ١١-١) . تختـلف سرعة الضوء تبعًا للوسط الذى يتحرك خلاله، ويعبر معامل انكسار الوسط عن نسبة سرعة الضوء فى الفراغ إلى سرعتـه فى وسط معين، ومعامل الانكـسار للهواء ١,٠٠٠٢٩ بينـما معامل الانكسار للـزجاج (العدسات والشرائح وأغطـية الشرائح) ١,٥ تقريبًا، فإذا ما انـتقل شعاع ضوئى من وسط معامـل انكساره منخفض (مـثل الهواء ١,٠٠٠٢٩) إلى وسط لـه معامل انكسار أكبر (مثل الزجاج ١,٥) فإن سرعته تتغيـر مما يؤدى إلى تغير اتجاهه وبالتالى ينكسر (أو ينعكس) الشعاع الضوئى، كما هو موضح بالشكل (١١ - ١) :

يحتوى المجهـر عادة على عدسات محدبة تسـتفيد من خصائص انعكـاس الضوء والتى تؤدى إلى تجمـع أو تشتت الأشعة الضـوئية تبعًا لشكـل العدسة، وتعتمـد صورة أى جسم يعترض مسار الضوء أثناء انتقاله خلال عدسة مـحدبة على شكل العدسة والمسافة بين الجسم والعدسة، فإذا ما كانت المسافة بين جسم ما وعدسة محدبة أكبر من مسافة البعد البؤرى (F) فإن الصورة المتكونة تكون حقيقية، ومقلوبة، ومكبرة ، تقع على الجانب المقابل من العدسة، وتعتبر الصورة حقيقية Real إذا أمكن استقبالها على شاشة أو حاجز من الورق يتخلل مسار الضوء عند النقطة التى تتكون عندهـا صورة الجسم، أما إذا كانت المسافة بين الجسم والعدسة المحدبة أصغر من مسافة البعد البؤرى فإن الصورة تكون تقديرية، ومعتدلة، ومكبرة، تتكون على نفس الجانب من العدسة الموجود به الجسم، ويقصد بالصورة التقديرية Virtual image تلك التى لا يمكن استقبالها على شاشة، وهـى فى واقع الأمر غير موجودة فى الفضاء لكنها صورة يكونها العقل عقب تجمع الأشعة الضوئية المشتته بواسطة قرنية وعدسة العين. وترجع أهميـة العدسة المحدبـة بالمجهر إلى قـدرتها على تكـوين الصورة علـى كلا جانبى الـعدسة وتكبيرها فى كلتا الحالتين .

بصريات المجهر الضوئى Optics of the light microscope

ينتج حقل الضوء السـاطع بالمجهر كمحصلة لأربع عدسات حيث يقـوم المكثف بتجميع





* ١ - يظهر أى شعاع مار بنقطة البؤرة موازيًا للمحور الرئيسى.

٢ - لا ينحرف أى شعاع يمر بالمركز البصرى للعدسة .

٣ - يمر أي شعاع موازٍ للمحور الرئيسى خلال نقطة البؤرة .

شكل (١١-١) : رسوم تخطيطية لهندسة البصريات (ويلى Willey ١٩٧١).

الضوء بإحكام على العينة فوق الشريحة، وتعطى العدسة الشيئية صورة مكبرة للعينة المراد فحصها (تتحكم جودة العينة فى نوعية الصورة النهائية التى ترى بالمجهر) وتقوم العدسة العينية بتكبير صورة العينة بشكلها النهائى الذى تنقله العين إلى المخ كما هو موضح بالشكل (١١-٢) .

يوضع الجسم AB المطلوب فحصه وطوله L على بعد من الشيئية أكبر قليلاً من بعدها البؤرى fobj فتتكون له صورة حقيقية مقلوبة مكبرة A_1B_1 وطولها L_1 ، تقع الصورة A_1B_1 على بعد من العينية أقل من بعدها البؤرى $f\alpha$ فتتكون لها صورة أخرى تقديرية مكبرة A_2B_2 وطولها L_2 عند أصغر مدى للرؤية الواضحة، وتكون الصور النهائية مقلوبة بالنسبة للجسم الأصلى، أى أن العدسة العينية فى المجهر الضوئى تقوم بعمل المجهر البسيط بالنسبة للصورة الأولى A_1B_1 .

تحفر عادة البيانات عن الخصائص البصرية على جانب العدسة الشيئية، على سبيل المثال قد يكتب ما يلى :

Plan 40 / 0.65

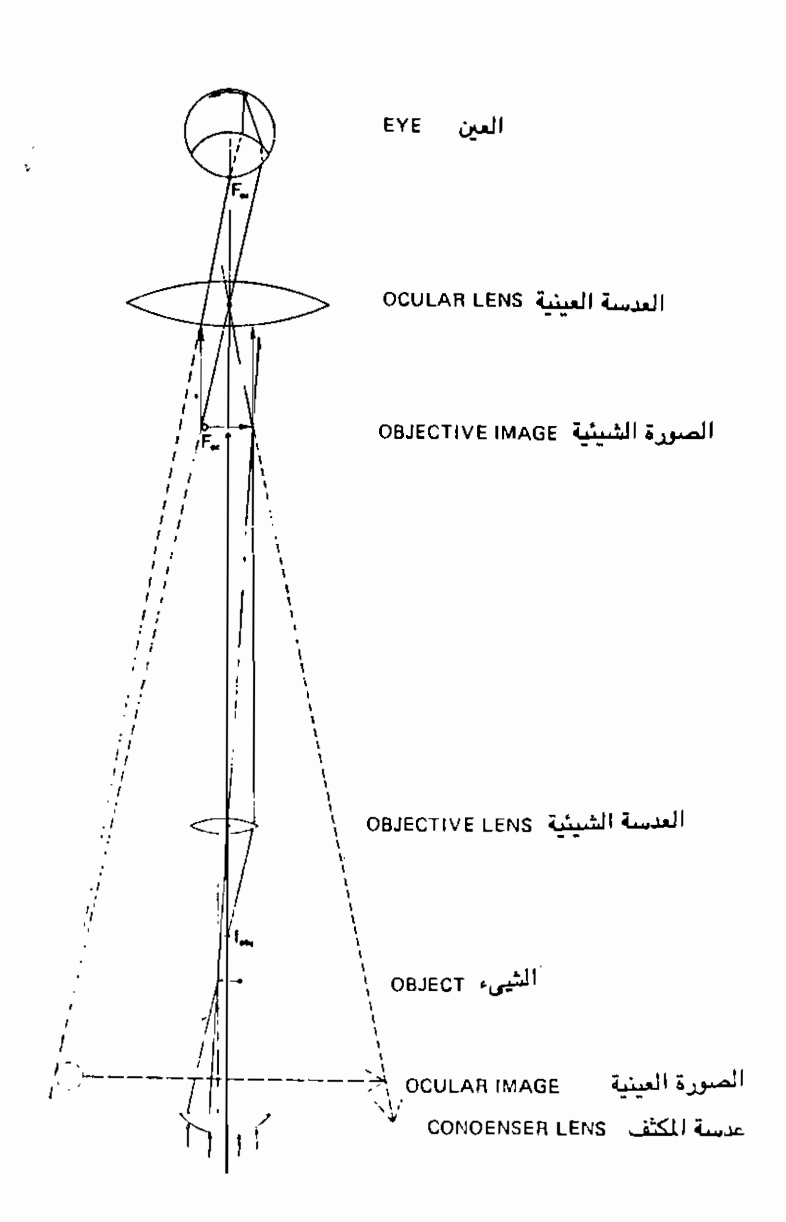
160 / 0.17

وتدل هذه الأرقام على :

المسافة العددية Numerical aperture / التكبير الأولى Initial magnification سمك غطاء الشريحة Coverslip thickness / طول أنبوبة المجهر Tube length .

ويعنى ذلك أن هذه العدسة الشيئية من النوع Planachromat تقوم بتكبير العينة ٤٠ مرة linear magnification ومسافتها العددية ٠,٦٥ وتصلح للمجهر الذى تبلغ طول الأنبوبة به ١٦٠ مم ومهيئة للاستخدام مع أغطية شرائح سمكها ٠,١٧ مم .

تتسبب أى عيوب فى تصنيع العدسة فى عدم تكوين صورة دقيقة وخلل فى قوة تكبيرها، وتوجد عدسات شيئية أجرى بها درجة من تصحيح معين لمعالجة عيوب التصنيع.



شكل (١١-٢) : تكوين الصورة فى المجهر الضوئى باستعمال نظام العدسة المفردة (ويلى Willey ١٩٧١) .

خصائص العدسات الشيئية Objectives

(١) التكبير Magnification

تتراوح قوة تكبير العدسات الشيئية ما بين 3.2 X حتى 100 X ولاتختص بالتكبيرات الأقل من 3.2 X بالمجهر العادى بل يقتصر استخدامهـا على المجهر مزدوج العدسة العينية، أما التكبيرات الأعلى من 100 X فقليلة ولها استخدامات محدودة مثل 120 X والقوة الأكثر استخدامًا فى العدسات الشيئية هى 10 X .

(٢) مسافة الشغل Working distance

هى المسافة بين غطاء الشريحة والعدسة الشيئية، وتكون هـذه المسـافة ٧ مم فى حالة 10 X و ٦,٠ مم فى حالة 43 X و ٣,٠ مم فى حالة 45 X و ١٣,٠ مم فى حالة 95X.

نستخلص من الأرقام المذكـورة ضرورة الاحتراس عنـد استخدام العدسـات ذات القوى الكبرى حتى لا تتعرض الشريحة للكسر لصغر المسافة بينها وبين الشيئية .

(٣) البعد البؤرى Focal length

تتضمـن العدسات الشيئية ٢-٩ عدسات وكلما كثر العدد ، كان البعـد البؤرى للشيئية معقدًا، ويحـفر عادة على الشيئية رقـم معادل الرؤيا Equivalent focus فالشيئية التى لها رقم معادل للبعد البؤرى (E.F.) يساوى ١٦ مم تعطى صورة مساوية فى الحجم للصورة التى تعطيها عدسة بسيطة بعدها البؤرى ١٦ مم وكلـما كبر التكبير ، صغر البعد البؤرى ويراعى عدم الخلـط بين العدد الدال علـى البعد البؤرى ورقـم مسافة الشـغل الدال على المسـافة بين الشيئية والغطاء .

مما سبق إذا ذكر أن قوة الشيئية ٤ مم فـهذا يعنى أن قوة تكبيرها 40 X تقريبًا، وعلى وجه التحديد 43 X فقد درجت المـصانع قديمًا على أن تكتـب رقم التكبير مـقربًا، وحاليًا يكتب الرقم الصحيح الـدال على قوة التكبير حتى يسهل على الباحـث حساب مقدار التكبير النهائى للعينة (قـوة تكبير الشيئية × قوة تكبير الـعينية) . كانت قوة التكبـير تكتب قديمًا 16-8-4-2mm أما الآن فتكتب 3 X - 5 - 10 - 20 - 40 - 60 - 70 - 90 - 95- 100 -120 .

(٤) عمق الرؤيا Depth of focus

لكل قطاع فى عينة نباتية مهما كان رفيعًا سـمكًا محددًا وعند استعمال الشيئية الصغرى 10 X نجد أنه عند ضبط الرؤيا عـلى الحافة العلوية لجدار خلية ما تظهر غـالبًا الحافة السفلية من قاعدة الجـدار، أما إذا استعملت شيـئية قوة 45 X وضبطت الرؤيا على الحـافة السفلية للخلية فإن جدارها العلوى لا يرى .

يعرف هذا الامتداد الرأسى لمنطقة الرؤيا الواضحة بعمق الرؤيا Depth of focus وهى تقل كلما كبرت قوة تكبير الشيئية ولو أن قوة التكبير ليست هى العامل الوحيد لذلك .

(٥) قوة التمييز Resolving power

وهى خاصية معينة فى العدسة يمكن بها التميـيز بين الأجسام بحيث تظهر مستقلة مهما كانـت المسـافة بـينهـا متـناهـية فـى الصغـر كمـا هو الحـال مع Chromomeres علي الكروموسومات Chromosomes ولو فرضـنا أن هناك نجمين مـتجاورين فإن زاويـة الرؤيا تصغر كلما بعد الإنسـان عنها، فإذا نظر إليهما شخص ضعيف فى قدرة الـتمييز فإنه يراهما كنجـم واحد ، بينما إذا نـظر إليهمـا شخص آخر لديه قـوة تمييز عالـية فإنه يراهـمـا اثنين لاواحدًا، فإذا قارننا ذلك بما يـحدث بالمجهر فإن العدسة الضعيفة تظهـر الكروموسوم الرفيع كخيط واحـد، بينما تظـهر العدسات ذات القـوى الكبيرة والـتمييز الجيد أن الـكروموسوم خيطان مـلتفان على بعـضهما Chromatids وذلك إذا فحـص الكروموسـوم أثناء عمـلية الانقسام .

وعلى ذلك ليس المهم أن يرى الشخص الأجزاء الصغيرة، ولكن الأهم من ذلك أصغر مسافة بين شيئين يمكن للعدسة أن تميز بينهما وتظهر كل منهما مستقلاً عن الآخر .

يعبر عن هذه القوة بمصطلح المسافة العددية Numerical aperture (N.A.) وهو العدد الدال على قوة الـتمييز، وكثيرًا مـا يكتب هذا العدد علـى الشيئيات، وهو صغـير إذا كانت العدسة صغيرة القوة (0.25 إذا كانت قوة الـعدسة 10 X) ويكبر كـلما كبرت قوة تـكبير العدسة فيصل إلى 1.4 للعدسة التى قوتها 90 X وأعلى رقم فى العدسات الجافة هو 0.95 حيـث توجد مسـافة هـوائية بـين العدسـة والغطـاء أمـا فى العدسات الـزيتية فيرتفع الرقم إلى 1.4 .

(٦) التوافق Synchronization or Parfocalization

يقصد بـه أنه إذا ضبطت الرؤيـة بواسطة العدسـة الصغرى 10 X فإنه عند استعمال الشيئيـة المتوسطة أو الكبرى عـندما تأخذ مكانهـا يجب أن تشاهد الصورة واضـحة بمجرد التغيير، وعند ذلك يسهل ضبط معالم الصـورة باستعمال الضابط الدقيق، أما إذا لم تشاهد الصورة واضحة وكانـت الشيئيات غير مجهزة بـالدقة المطلوبة وتحتاج إلى اسـتخدام الضابط التقريبـى فإن ذلك يعرض العدسات لـلتلف خاصة للمبـتدئ نتيجة لكثـرة خدش أو تكسر الشرائح .

(٧) انواع الشيئيات Objectives

توجد أنواع مختلفة من الشيئيات مثل :

(أ) Achromatic وهى أرخص أنـواع الشيئيات ثـمنًا وتستعمـل فى الأعمال الروتيـنية كالتدريس، ومن خصائـصها تصحيح أخطاء اتجاه لونين من ألوان الـطيف الناشئ عن تحليل الـضوء المخترق لحواف التـحضير أثناء فـحصه ، وكذلك لون مـن الألوان التى تخترق مركز التحضير .

(ب) Apochromatic وهى تصحح أخطاء ثلاثة ألوان حافية Chromatic aberrations وكذلك لونين مركزين Spherical correction وبذلك تظهر الـصورة واضحة لامعة بألـوانها الحـقيقيـة ودون تغيـير فـى شكلـها ، وتعـطى نتائـج ممتازة فـى التصـوير الفوتوغرافى. لكل هذه المميزات فهى غالية الثمـن نتيجة لتركيبها المعقد وقلة العدسات من النوع Fluorite .

(جـ) Fluorite وتسمى كذلك نسـبة إلى معدن الفلوريت الذى يستعمـل ملتحمًا مع نوع خاص مـن زجاج البصـريات، وهذه العـدسات من خـصائصهـا أنها ذات قدرة عـلى تصحـيح الألوان تفـوق النوع Achromatic لذلك تفـضل فى التصوير الفـوتوغرافى ولايوجد منها سوى القوى التى تزيد عن 40 X .

خصائص العدسات العينية Oculars (Eyepieces)

يلزم لـمن يستعمـل المجهر الإلمام بـخصائص العـينيات حتـى يستعـمل منها مـا يلائم

الأغراض المختلفة لـلفحص، ويختار من العينيـات ما يوافق الشيئيات المختلـفة، لكل عدسة عينـية بعـد بـؤرى خاص، ولكن المتبع حاليًا هو كتابة قوة التكبير عـليها والـتى تتراوح ما بين 4-30 X .

يمكن حساب قوة العينيـة التى يلزم استعمالها مع شيئية معلـومة القوة ، وتعرف المسافة العددية لها .N.A من المعادلة التالية :

$$\frac{\text{(للشيئية) N.A.} \times ١٠٠٠}{\text{قوة تكبير الشيئية}}$$

فإذا فرض أن شيئية قـوة تكبيرها 43 X و .N.A ٠,٦٥ تكون قوة العيـنية الواجب استعمالها هو :

$$\frac{٠,٦٥ \times ١٠٠٠}{٤٣} = ١٥ \text{ تقريبًا}$$

وعلى ذلك فإن استعمـال الشيئية قوة 43 X واستعمال عيـنية أعلى من 15 X يصبح عديم القيمة إذا تطلب الأمر زيادة قدرة التمييز Resolving power لأنها وصلت إلى حدها الأقصى، ولكنها تفيد فى العد أو الرسم .

ويفيد اسـتعمال المعادلة السـابقة عند شراء العدسـات لعمل التوافيق الـلازمة بين قوى العينيات والشيئات المطلوب شراؤها .

وتوجد أنواع عديدة للعينيات أهمها ما يلى :

(أ) Huygenian :

وتتركـب من عدستين، وهى مـعدة للاستعمـال مع شيئيات مـن النوع Achromatic وتعطى صوراً ضعيفة مع الشيئيات من النوع Apochromatic .

(ب) Compensating :

وهى معدة بحيـث تعوض أى نقص فى تركيب الشيـئيات من النوع Apochromatic

ولذلك تستعمل كل منهما مع الأخرى بحيث تـكونا من نفس الماركة ، كما يمكن استعمالها مع شيئيات من النوع Achromatic أو Fluorite أعلى من قوة 40 X .

وتوجـد أنواع أخرى أقـل أهميـة مثل الـنوع Flat field ومنهـا صنفين تجـاريين : Hyperplane و Planescopic ويؤخذ علـى هذا النوع أن العين يجب أن تـظل فى وضع ثابت لا تـتحول عنـه لأن أى حركة من الرأس تـضيع جزءًا مـن حقل المجهـر (جزءًا من الصورة)، كما أن العين تجهد إذا استعملت لمدة طويلة .

ويوجد أيضاً النوع Wide field الذى يعطى حقلاً متسعًا ولكن لهذا النوع نفس مشاكل النوع Flat field .

الإضـــاءة Illumination

تستـعمل المرآة كمـصدر للإضاءة وهى ذات وجـه مسطح وآخر مـقعر، كما يـوجد فى المجهر المستخدم فـى البحوث مكثف Condenser ويتركـب من عدسـتين أو أكثر . وأنسب الأنواع ذلك الذى يتركب من عـدستين مثل النوع Abbe وهذا المكثف غير مهـيئ لتصحيح الأخطاء النـاتجة عن تحليل الضـوء (الألوان) أو الميل Curvature الذى قد يوجـد فى حقل المجهر، لذلك يستـعمل فى الأعمال الروتينيـة مثل دراسة الطلبة أو البحـوث الأولية، وقيمة N.A. لهذا المكثف 1.20 أو 1.25 والعدسة العليا منه يمكن حلها والاكتفاء بالعدسة السفلية وبالتالى تصير .N.A لها 0.30 وتستعمل فى هذه الحالة مع القوة 10 X (.N.A لها ٢,٥ أو أقل) . فى المـكثف Leitz تحمل العدسة العلوية عل حامـل منفرد وبذلك يمكن تحريكها جانبًا حتى يمكن استعمال العدسة السفلـية بمفردها إن تطلب الأمر ذلك، وبالتالى يمكن ملء حقل العدسات الضعيفة بالضوء .

فى المكثف Abbe ذى الثلاث عدسات تكون المـسافة العددية N.A. 1.4 ويستعمل مع الشيئيات التى .N.A لها 1.25 ويعد هذا المكثف أحيانًا بحيـث يمكن تحريك وإبعاد العدسة أو الاثنتين الـعلويتين ، وبذلـك تصير .N.A 0.70 أو 0.40 بإبعاد عدسـة فى الحالة الأولى واثنتين فى الحالة الثانية .

توجد أنواع أخرى من المكثفات أكثر دقة ومـعدة بحيث تصحح أخطاء الألوان أو الميل فى حقل المجهـر نتيجة النقص فى الـتركيب وبذلك تظهـر الصورة على هيئة القـبة، أهمها

النوع Aplanatic والنوع Achromatic ويتركب من ثلاث عدسات منفصلة تتراوح N.A. لها ما بين ٠,٢٠ إلى ١,٣ أو ١,٤ .

أعلى درجة للمسافة العددية N.A. يمكن الحصول عليها بمكثف وشيئية يفصلهما عن الشريحة فراغ هوائى تساوى ١٠٥، لذلك إذا استعملت شيئية N.A. لها ١,٣٠ فإنه يجب استعمال زيت السيدر ليصل بين الشريحة والشيئية وكذلك بين المكثف والشريحة ليمكن الحصول على الحد الأقصى لقوة التمييز Resolving power .

أحيانًا بدلاً من أن تخترق الأشعة القطاع من أسفل تسلط الأشعة الضوئية على حواف العينة وبذلك تصل الإضاءة إلى العين بواسطة الانعكاس من سطح العينة ، وتعرف هذه الإضاءة باسم Dark - field illumination وبذلك تظهر العينة كأن الإضاءة صادرة منها فى وسط أسود، وأبسط وسيلة لذلك استخدام قرص معدنى على شكل عجلة يوضع تحت المكثف ويحجب وسطه وسط الحزمة الضوئية المنعكسة من المرآة والمتجهة إلى إضاءة العينة مخترقة المكثف ، وبذلك تضاء العينة من الأشعة الحافية المائلة للحزمة الضوئية المنعكسة من المرآة .

توجد مكثفات معدة خصيصًا لهذا الغرض، وتستعمل هذه الطريقة من الإضاءة فى دراسة الطحالب البسيطة والفطريات، كما تستعمل فى فحص القطاعات غير المصبوغة ويمكن رؤية حركة السيتوبلازم فى أوراق الإلوديا ونوايات الإسبيروجيرا بوضوح تام بهذه الطريقة .

التكبير Magnification

يشار عادة لقوة التكبير على الرسم بوضع خط أسفله يعبر عن مقياس الرسم Scale line ويتم تحديد مقياس الرسم بقياس العينة بالعينية الميكرومترية Ocular micrometer أو المائدة المتحركة ذات الورنية Mechanical stage vernier ، وهى مقياس صغير منزلق على أداة مدرجة، وأقل قياس يقدره هو ٠,١ مم .

ولا شك أن تقدير قوة التكبير من خلال خط يعبر عن مقياس الرسم أدق بكثير من حساب التكبير من المعادلة التقليدية التالية :

قوة التكبير = قوة تكبير العينية × قوة تكبير الشيئية

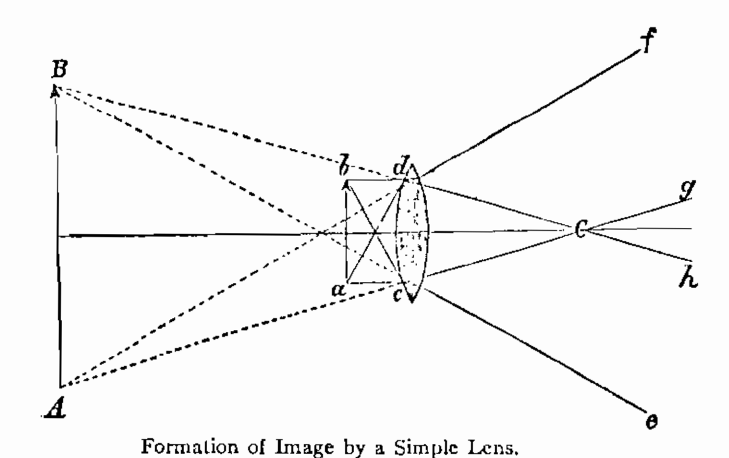
انواع المجاهر

Microscope types

كثيرًا من الكـائنات الحية من الدقة بحيـث يصعب مشاهدتها بالـعين المجردة ، كما أن كثيرًا من مكونات الـكائن الحى يستحيل رؤيتها هى الأخرى بالـعين المجردة، من هنا نشأت الحاجة إلى البـحث عن وسيلة للتـكبير حتى يمكن رؤيـة ودراسة الكائنات الحية ومـكوناتها الدقيقة - وهذه الوسيلة هى المجهر (الميكروسكوب) .

أولاً : المجهر البسيط Simple microscope

إذا وضع شيئًا ما بين عدسة محدبة الوجهين وبـؤرتها تتكون له صورة مكبرة فى موضع بعيدًا عن العدسة خلف هذا الشيء، فى الشكل (١١ - ٣) dc عدسة محدبة الوجهين،و ab الشيء، و bd و ac شعاعان موازيـان للمحور البصرى، تـنكسر الأشعة بواسطـة العدسة وتتجمع فى نقطة البؤرة c وتنحرف بعد ذلك إلى g و h حيث تلتقى بشبكية العين، وتنكسر الأشعة ad و bc جهة f و e ثم تلتـقى هى الأخرى بشبكـية العين، تشاهد الـعين الصورة المكبرة AB حيث تتكون الخطوط كامتداد للأشعة المنكسرة (fA - gA) و (eB - hB) .

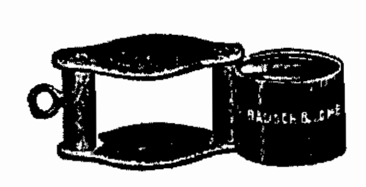


Formation of Image by a Simple Lens.

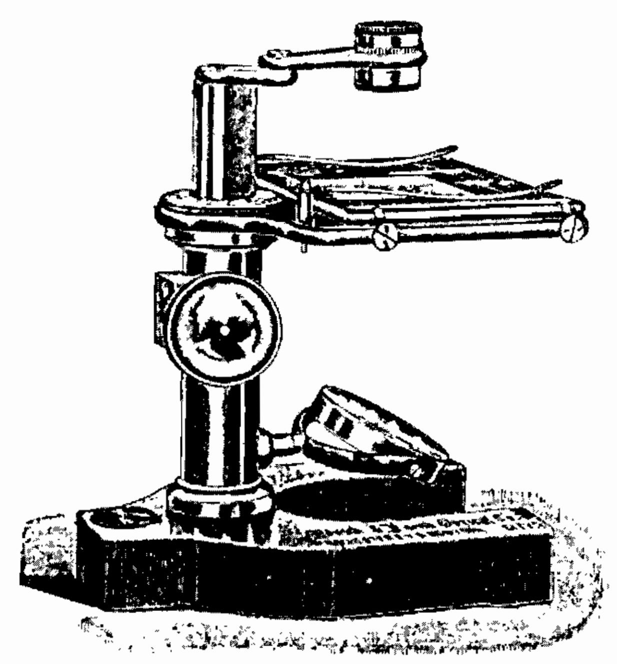
شكل (١١-٣) : كيفية تكون الصورة المكبرة فى المجهر البسيط (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧) .

تعرف العدسة، أو مجموعة العدسات، التى تعطى هذا التكبير بالمجهر البسيط، وتوضع العدسات عادة فى حامل معدنى، أو مطاط قوى، وترتب بطريقة تسمح باستخدام أكثر من عدسة معًا، قد ترتب العدسات على محور متحرك داخل غطاء، وتفتح عند الاستخدام على شكل عدسة جيب Pocket lens (شكل ١١-٤) .

ويعتبر مجهر الفحص الدقيق Dissecting microscope (شكل ١١-٥) من أكثر الأشكال المتداولة والمقبولة حيث تحمل العدسة على ذراع يتحرك رأسيًا على ترس للحصول على صورة دقيقة بينما يوضع الشئ المطلوب فحصه على لوحة زجاجية على مائدة وقد يزود بمرآة لتعكس الضوء على الشئ المطلوب فحصه .



شكل (١١-٤) : عدسة جيب (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).



شكل (١١-٥): مجهر الفحص الدقيق Dissecting microscope (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

ثانيا : المجهر المركب (الضوئى) Compound microscope

المجهر المركب (أو المجهر الضوئى Light microscope) من أهم الأجهزة المعملية التى تتطلبها دراسة العلوم البيولوجية، وتتلخص الطريقة التى يعمل بها المجهر الضوئى فى تخلل العينة المطلوب فحصها بحزمة من الضوء ثم مرور هذه الحزمة فى نظام من العدسات المكبرة تعمل على تكبير وإيضاح أبعاد العينة المراد دراستها .

تركيب المجهر الضوئى

يتركب المجهر الضوئى (شكل ١١-٦) من الأجزاء التالية، ويجدر الإشارة إلى أن هناك عديداً من الأشكال التى يوجد عليها المجهر، ويرجع ذلك إلى التطور المستمر فى صناعة المجهر، وبالتالى قد توجد بعض أجزاء المجهر التالية أو قد يوجد بديل آخر لها أكثر تطوراً.

(١) أنبوبة المجهر Body tube : وهى الجزء الرئيسى بالمجهر، يبلغ طولها ١٦ سم، ذات شكل أسطوانى تحمل فى طرفها العلوى العدسة العينية Ocular lens وهى واحدة، أو قد تكون اثنتين، ويوجد فى الطرف السفلى لأنبوبة المجهر القطعة الأنفية Nose piece تحمل ١-٤ عدسات شيئية Objective lenses مختلفة القوى، ويوجد ترس على جانب الأنبوبة يساعدها على الحركة رأسيًا .

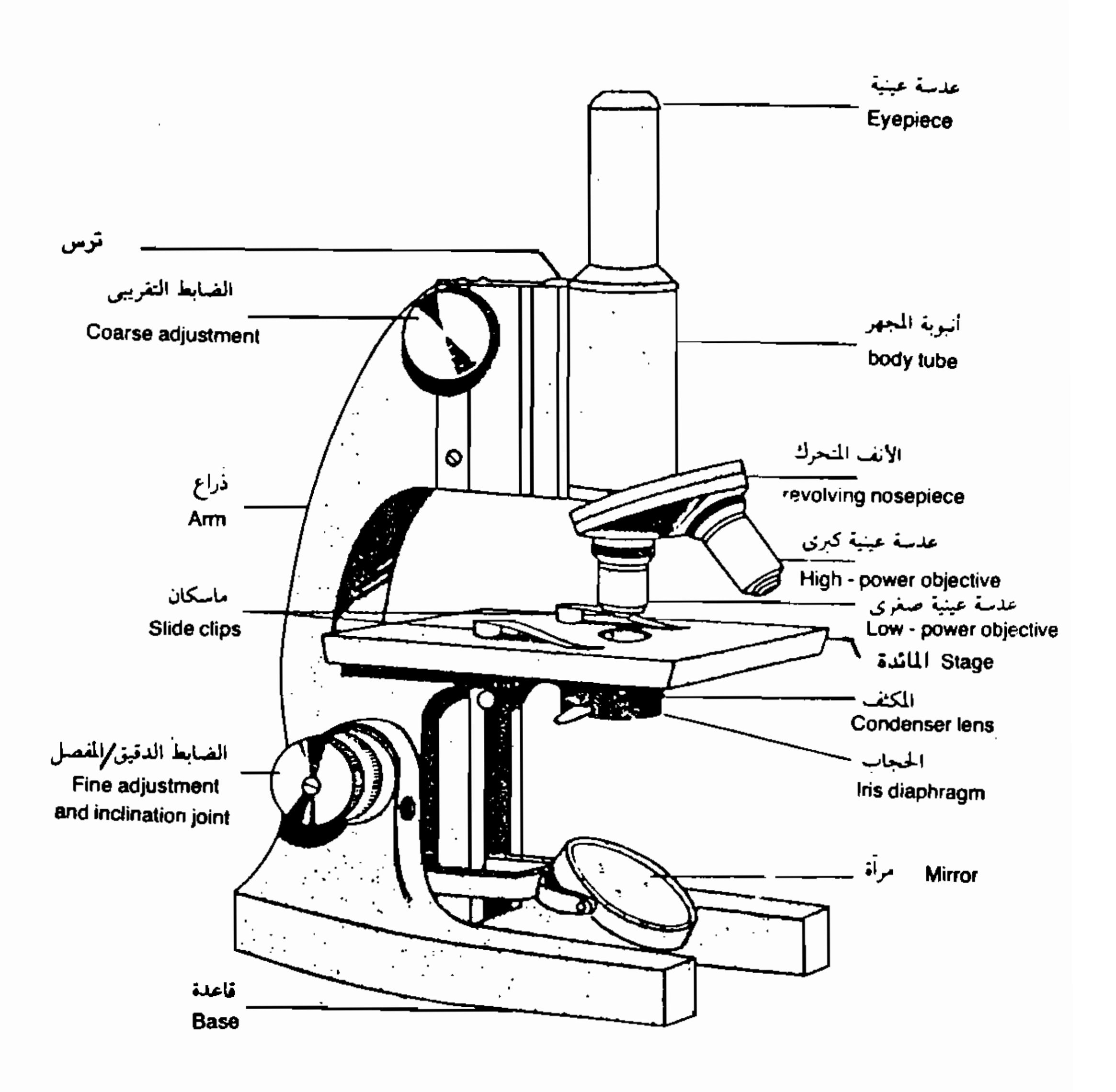
(٢) الذراع Arm : وهى الجزء الذى يحمل منه المجهر عند التداول .

(٣) القائم Standard : جزء أسطوانى يقع بين المائدة والقدم .

(٤) المفصل Joint : ويستخدم فى إمالة المجهر لتيسير استعماله ويقع بين القائم والذراع .

(٥) القدم Foot : ويمثل قاعدة ارتكاز المجهر (لذلك يصنع من معدن ثقيل الوزن)، ويكون على شكل حدوة الحصان أو حرف Y .

(٦) المائدة Stage : جزء مستوٍ على هيئة رف، قد تكون مربعة أو مستديرة حيث توضع الشريحة وعليها العينة المطلوب فحصها، ويوجد فى منتصف المائدة ثقب مستدير يسمح بمرور حزمة الضوء خلال العينة المطلوب فحصها، والمائدة مزودة بماسكين Clips صغيرين للتحكم فى وضع الشريحة عند الرغبة فى إمالة المجهر، وقد يوجد ماسك واحد كبير متحرك .



شكل (١١-٦) : المجهر الضوئى (باعشن والغزاوى ١٩٨٥).

(٧) ضابط تقريبى Coarse adjustment : ويستخدم فى تحريك أنبوبة المجهر رأسيًا بأبعاد ملموسة للحصول على صورة للعينة المطلوب فحصها، ويستخدم عادة مع العدسات الشيئية ذات القوة الصغيرة .

(٨) ضابط دقيق Fine adjustment : ويساعد فى تحريك أنبوبة المجهر رأسيًا لمسافات صغيرة جدًا، ويستخدم مع العدسات الشيئية ذات القوة الكبيرة للحصول على صورة للعينة دقيقة واضحة .

(٩) المرآة Mirror : ذات سطحين أحدهما مستوى والآخر مقعر لجمع وتوجيه الأشعة الضوئية خلال العينة أثناء فحصها، وقد يكون الضوء طبيعيًا باستعمال ضوء الشمس غير المباشر أو صناعيًا بواسطة لمبة كهربائية، ويستغنى عن المرآة فى حالة وجود لمبة كهربائية مثبتة أسفل مائدة المجهر وهو الأكثر شيوعًا .

(١٠) المكثف Condenser : جهاز مثبت أسفل المائدة يقوم بتجميع الأشعة الضوئية التى تتخلل العينة وتكثيفها للحصول على أفضل إضاءة للفحص ؛ خاصة عند استخدام القوى الكبرى .

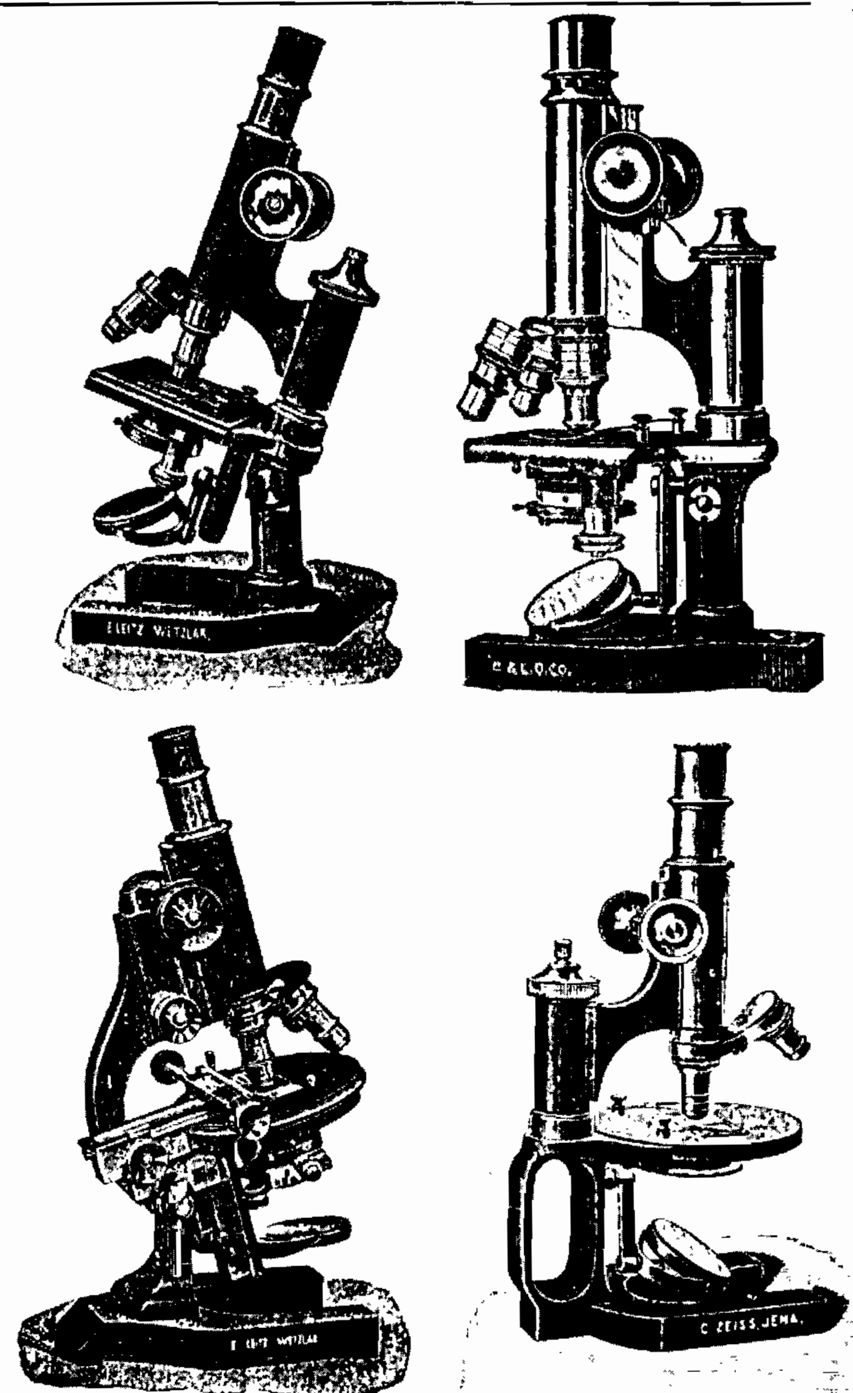
(١١) الحجاب Diaphragm : يثبت أسفل المكثف للمساعدة فى الحصول على أفضل الظروف الضوئية للفحص .

توضح النماذج (شكل ١١-٧ و ١١ - ٨) طرزًا مختلفة للمجهر فى بدايات صناعته وكذلك الطرز الحديثة منه حيث تطورت إمكانيات الفحص به بصورة مذهلة ، وتعددت أشكاله وتقدمت قدراته مما ساعد على قطع أشواط بعيدة فى تعرف التركيب التشريحى للأعضاء المختلفة للنبات وكذلك تسجيل ما يتم فحصه بكاميرات التصوير المجهرى المتقدمة الصنع .

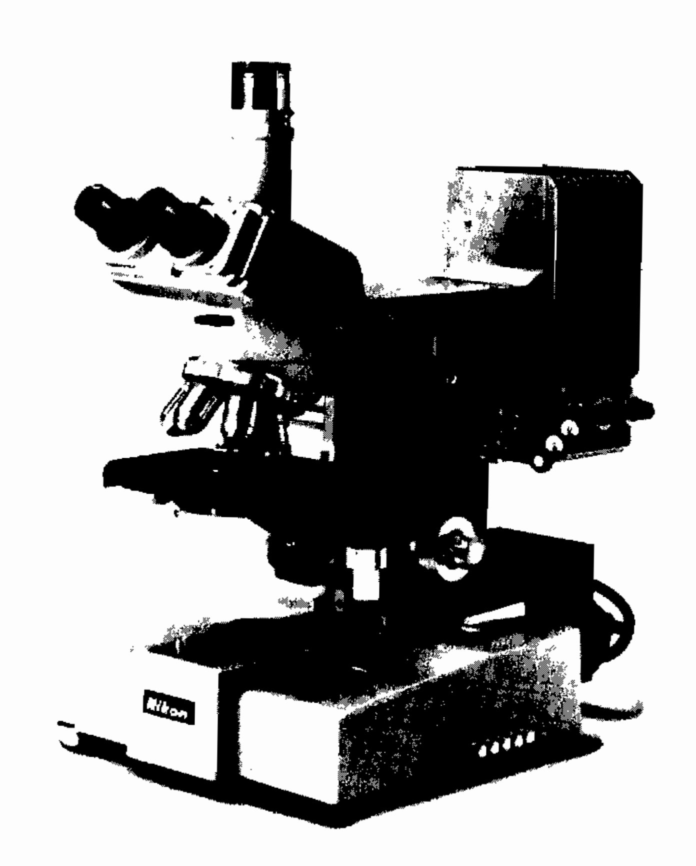
استعمال المجهر الضوئى

(١) تعامل مع المجهر بعناية ورقة واحذر القوة والعنف عند استخدامه .

(٢) تأكد من نظافة العدسات العينية والشيئية وكذلك المرآة ولا تلمسها بأصابعك بطريقة خاطئة حتى لا تترك عليها أية آثار تعيق الرؤية الواضحة .



شكل (١١-٧) : بعض طرز المجهر فى بدايات صناعته توضح الشكل الذى كانت عليه الموديلات المختلفة التى سادت آنذاك (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).



شكل (١١-٨) : أحـد الطرز الحديثة لـلمجهر توضـح تطور تقنيـة صناعته والكـاميرا الملحقة به للتصوير المجهرى.

(٣) يمكن إزالة قطرات الماء أو البصمات من على العدسات أو المرآة باستخدام قطعة من قماش نظيفة أو الورق الخاص بالتنظيف .

(٤) يراعى أن تكون الإضاءة على أكمل وجه أثناء فحص العينة، سواء كان مصدر الضوء مستقلاً أو مثبتًا بالمجهر - ويساعد المكثف والحجاب فى تنظيم الإضاءة حتى تكون الصورة تامة الوضوح .

(٥) عند فحص شريحة مجهزة، تستخدم القوة الشيئية الصغرى (أقل من 10 X) أولاً وتضبط الصورة فى هذه الحالة بواسطة الضابط التقريبى، وإن تطلب الأمر تستخدم بعد ذلك القوة الشيئية الكبرى (أكبر من 10 X) مع استخدام الضابط الدقيق وفى هذه الحالة تأكد من وضع غطاء الشريحة فوق العينة المحضرة فى المعمل .

(٦) احذر جفاف التحضير أثناء الفحص .

(٧) تأكد من فتح عينيك جيدًا خلال الرؤية فى العدستين العينيتين أثناء الفحص .

(٨) بعد تمام الفحص ترفع الأنبوبة بعيدًا عن المائدة ، ثم تسحب الشريحة وينظف المجهر جيدًا .

ملحقات المجهر Microscopic accessories

يزود المجهر عادة بمجموعة من إضافات اختيارية لتعظيم قدر الاستفادة منه، من هذه الإضافات ما يلى :

(١) الميكروميتر Micrometer

يستخدم الميكروميتر لقياس أبعاد معينة فى عينة مجهرية ، ويتكون من قطعتين :

(أ) القطعة العينية للميكروميتر Eyepiece micrometer

تتركب من تدريج محمل على قطعة عينية، يمكن عند وضعها برفقة العدسة العينية مشاهدة أقسام هذا التدريج، كما يمكن فى الحال مضاهاة أي عينة مجهرية أو جزء منها بهذا التدريج، ولما كان ما يشاهد خلال المجهر لا يمثل الحجم الطبيعى للعينة ، وإنما العينة مكبرة من خلال العدستين الشيئية ثم العينية ، فإن القراءة المباشرة للقطعة العينية للميكروميتر

لا تعطى الأبعاد الحقيقية للعينة التى يـجرى قياسها، لذلك لابد من تحديد عامل ثابت لكل عدسة شـيئية من عدسـات المجهر، ولإجراء ذلك تـتم معايرة بـاستخدام قطعـة أخرى هى الشريحة الميكرومترية Stage micrometer .

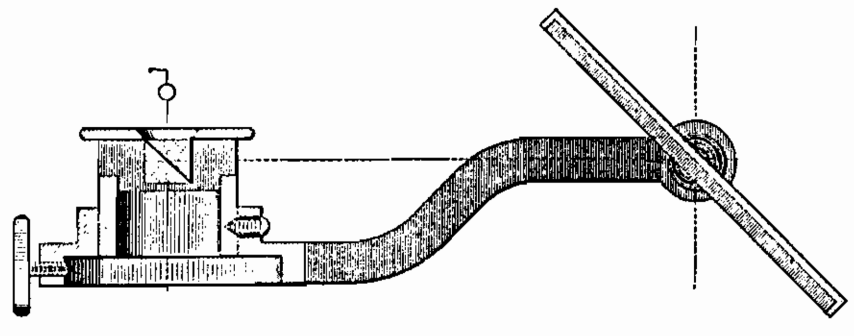
(ب) الشريحة الميكرومترية Stage micrometer

تجرى معايرة Calibration القطعة العينـية للميكروميتر باستخدام شريـحة ميكرومترية ذات مقياس مدرج طوله عادة ١ مم مقسم إلى ١٠٠ قسم (القسم = ١٠ ميكرون) ومن خلال الفحص المجهرى يقدر عدد الأقسام بالقطعة العينية للميكروميتر ، التى تقابل عددًا محددًا من أقسام الشريحة الميكرومترية ، وبالتالى يتم تحديد القياس الحقيقى لكل قسم بالقطعة العينية، وتكرر العـملية مع كل عدسة شـيئية عند استخـدامها، وبذلك يمكن حسـاب أبعاد أى جزء بالعينة تحت الدراسة ، مـن خلال تقدير عدد الأقسام المساوية لها بالقطـعة العينية، وحساب الأبعاد الفعلية المطلوب تحديدها .

(٢) كاميرا لوسيدا Camera lucida

كاميرا لوسيدا جهاز على درجة كبيرة من الأهمية يساعد فى رسم العينة المجهرية، حيث يجرى بطريقة معينة نقل صورة العينة المجهرية إلى ورق الرسم، وفى حالات أخرى تعكس صورة سن القلم لتظهر فوق الصورة التى تشاهد خلال المجهر .

يجرى تثبـيت حلقة الجهـاز (شكل ١١-٩) بـالطرف العلـوى لأنبوبة المجهر بـواسطة مقبض بريمى إلى اليسار وبمساعدة مسمارين قلاووظ، يشتمل المكعب الزجاجى على منشورين ملتحـمين معًا، يطلى السـطحان القطـريان الملتحمـان معًا بالفضة فـيما عدا موضع صـغير بالمنتصف، وتوجد مرآة تتحرك مفصليًا على ذراع بحيث تبعد النقطة الوسطية للمرآة أفقيًا عن منـتصف المجهر بمسافة ٧٠ مم، يضبط المكعب الزجاجى بحيث تمر الـصورة التى تظهر من خلال العدسـة العينية دون أى عوائـق خلال الموضع الصغـير المجهز خلال السطـح الفضى بحيث ترى بالعين فى الوقت الذى تنعكـس صورة قلم الرسم بواسطة المرآة من خلال ثقب فى إطار نحاسى يحيط بالسطح الفضى ، والـتى تنعكس بدورها وترى بالعين، تتحرك المرآة بصورة تـسمح بنقل الـرسم فى الموضع المطـلوب على الورقة، ويـزود الجهاز بقطعـتين من الزجاج المدخـن المتحرك توضعان بـين المرآة والمكعب الزجاجـى للتحكم فى كـمية الإضاءة اللازمة لوضوح الصورة .



Abbé Camera Lucida. (Zeiss.)

شكل (١١-٩) : رسم تخطيطى للكاميرا لوسيدا (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

بالإضافة إلى ما سبق قد يزود المجهر بمكثف Condenser - حجاب Diaphragm - جهاز ضوء مستقطب Polarization apparatus - مائدة متحركة Mechanical stage - آلة تصوير Camera - شاشة عرض Monitor - عدسة عينية إضافية تمكن شخصان من المشاهدة فى ذات الوقت .

وتتبارى مصانع البصريات فى تقديم كل حديث من الملحقات التى تضاف إلى المجهر والتى تساعد الباحثون فى الحصول على أدق وأفضل النتائج .

فحص الشرائح بالمجهر الضوئى Slide analysis by light microscope

لا يقف الأمر عند تحضير شرائح عالية الجودة، بل يلزم فحصها، وإمكانية تعرف أنواع الخلايا فى الأنسجة المختلفة، وكذلك تحديد مكوناتها، وهذا يتطلب بطبيعة الحال دراسة علم تشريح النبات حتى يتمكن الدارس من قراءة الشريحة بدقة . بداية تفحص الشريحة بصورة إجمالية حتى يمكن تعرف الأنسجة المختلفة بالعينة، واستجابة الأجزاء المختلفة منها للصبغات المستخدمة، وذلك يتطلب خبرة ومهارة خاصة، وعمومًا يمكن اتباع ما يلى :

(١) تحدد المواضع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة، كما يلزم الإلمام بالوظائف العامة للأعضاء تحت الدراسة، ويفضل الرجوع إلى عينات مرجعية إذا كانت متاحة بالمعمل .

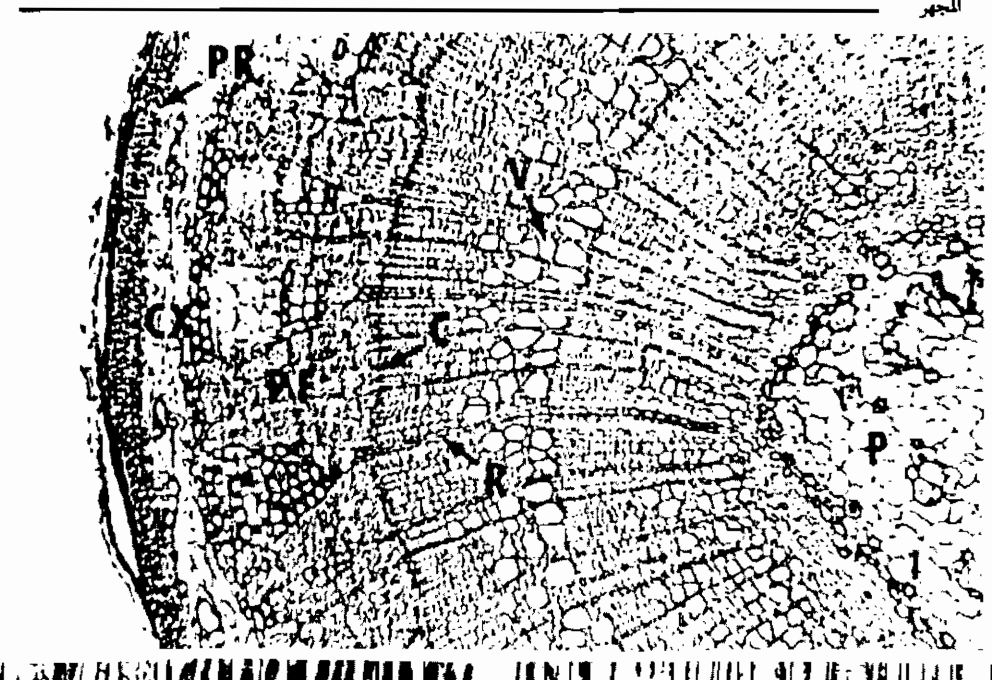
(٢) تلاحظ الاستجابة النوعية لكل طرز من الخلايا لـلصبغات المستخدمة، فعادة ما يتطلب الأمر تحديد المعلومات التى تمدنا بها كل صبغة من مجموعة الصبغات المستخدمة، والتى قد تفيد كذلك فى تحديد وظيفة هذه الخلايا .

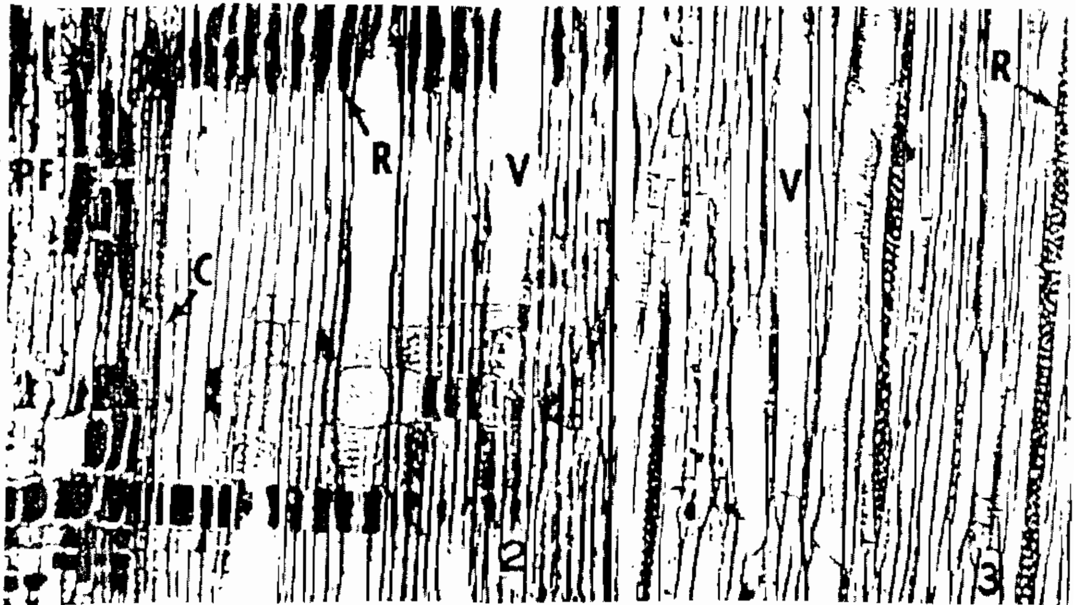
(٣) يحدد الارتـباط بين كل من تـركيب والاستجـابة للصبـغات وموضع كل مـن الخلايا الرئيسية مع وظيفة العضو الجارى دراسته .

(٤) يراعى ما قد يوجد من اختلاف فى الاستجابة لـلصبغة باختلاف خطوات العمل، ومن خلال ذلك يمكن تحديد أفضل السبل الواجب اتباعها للحصول على النتائج المرجوة .

(٥) يلزم أن يكون الدارس على وعى بكل دخيل على التحضير مثل فقاعات الهواء، وذرات التراب، وترسيبات الصبغة، وقطرات الماء، وغير ذلك - ويجب أن يغتنم الدارس هذه اللحظة لـلوقوف على ما قد يراه مـن أخطاء وعيوب فى التحـضير ليتجنبـه فى أبحاثه التالية، وتبدو أهمـية ذلك إذا ما تناول البحث عينات على درجـة كبيرة من الأهمية أو ربما تكون عينات لأنسجة لا بديل لها .

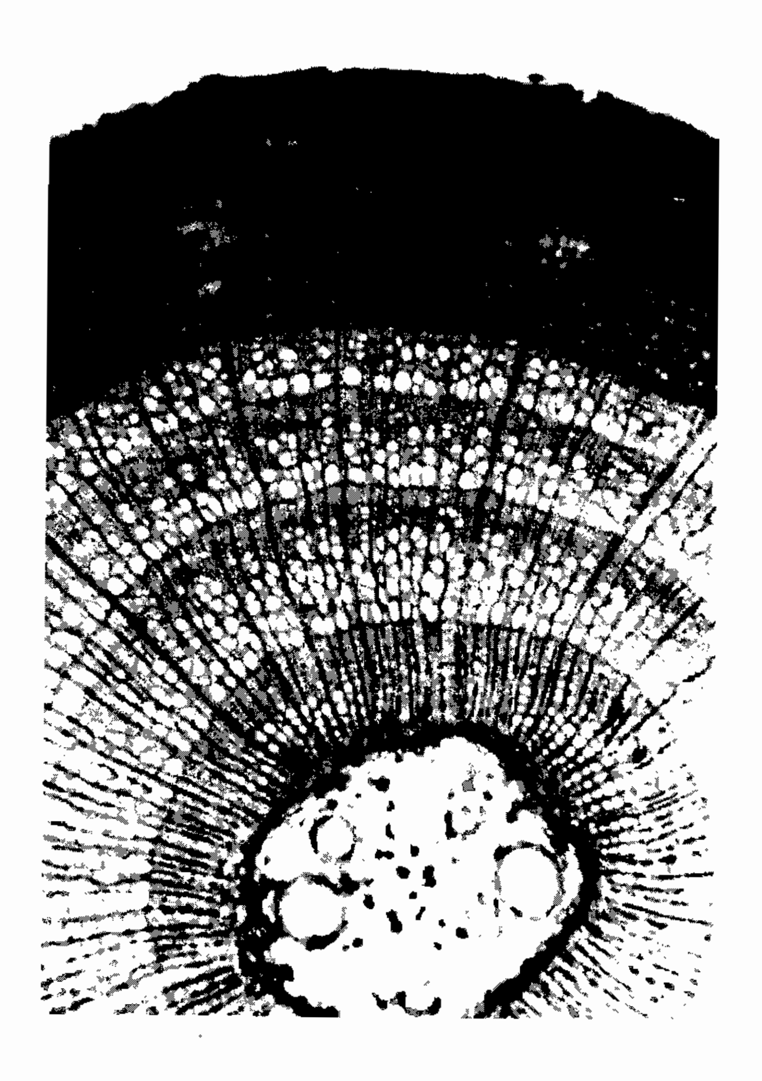
تـوضح الأشـكـال (١١ - ١٠) و (١١ - ١١) و (١١ - ١٢) و (١١ - ١٣) و(١١ - ١٤) قطاعات فى ساق وجـذر بعض نباتات ذوات الفلقة الواحـدة وذوات الفلقتين كما تظهر أثناء الفحص بالمجهر . لاحظ المواضع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة ، واختلاف استجابة كل منها للصبغات المستخدمة .





شكل (١١-١٠) : قطاعات فى اتجاهات مختلفة لساق نبات التليا باستخدام .F.A.A وسفرانين - أخضر سريع .

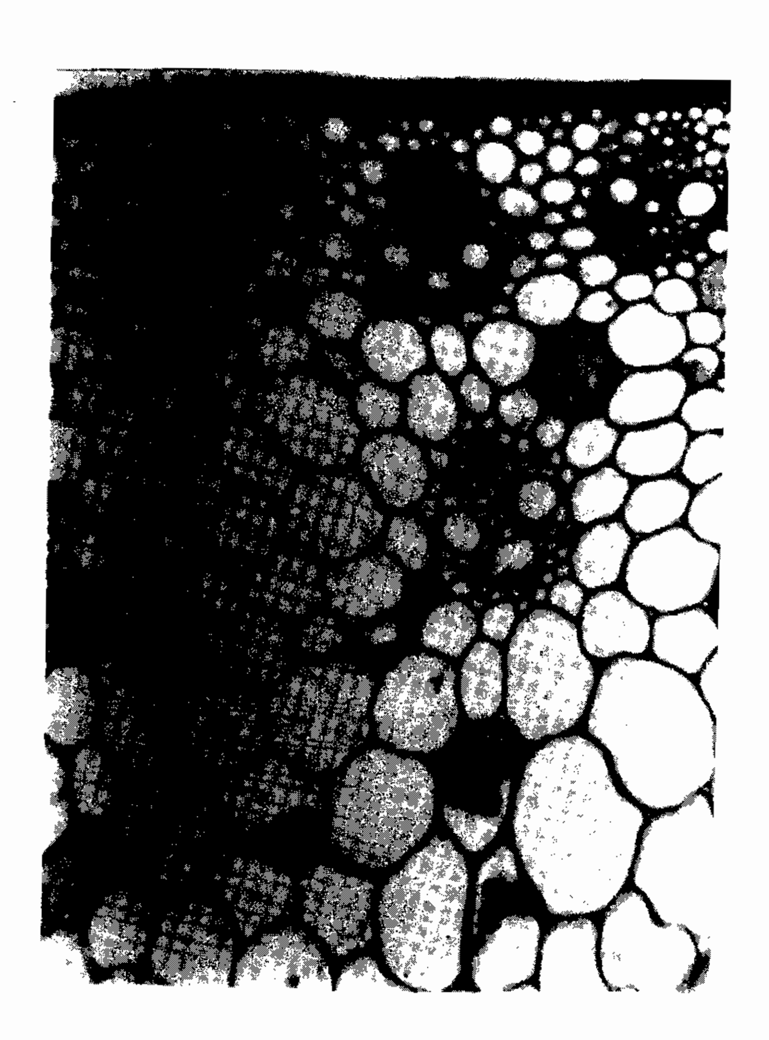
(1) قطاع عرضى 40 X . (2) قطاع قطرى 200 X . (3) قطاع مماسى 200 X.
(C) كامبيوم - (CX) قشرة - (P) نخاع - (PF) ألياف لحاء - (PR) بريدرم - (R) شعاع وعائى - (V) وعاء خشب (ويلى Willey ١٩٧١).



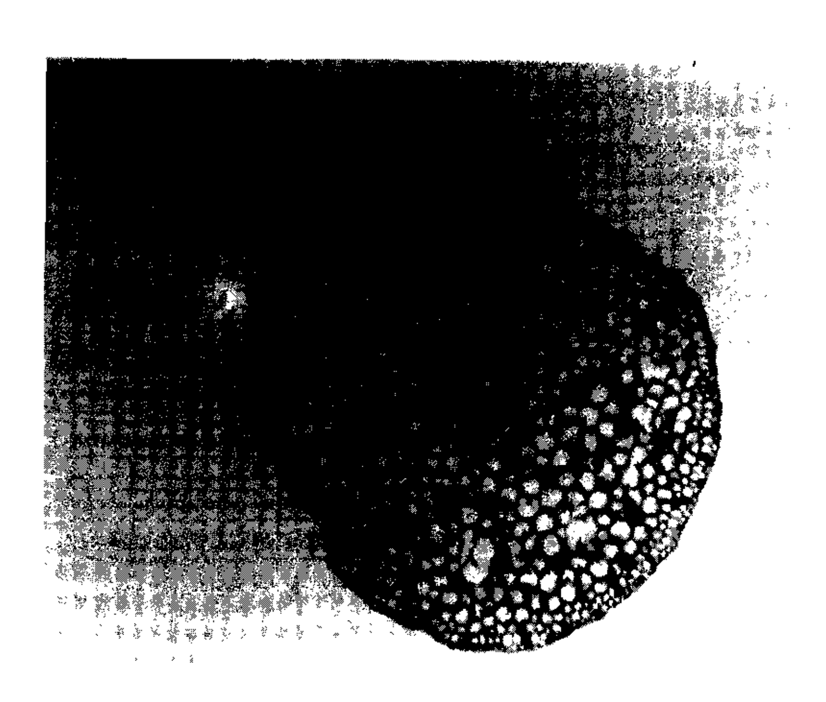
شكل (١١-١١) : قطاع عرضى فى ساق نبات التليا يوضح حلقات النمو السنوية .



شكل (١١-١٢) : قطاع عرضى فى ساق نبات اللوف من النباتات ذوات الفلقتين .



شكل (١١-١٣) : قطاع عرضى فى ساق نبات الذرة من النباتات ذوات الفلقة الواحدة.



شكل (١١-١٤) : قطاع عرضى فى جذر نبات الشقيق من النباتات ذوات الفلقتين.

ثالثا : المجهر الإلكترونى

Electron microscope

يمكن للعين المجردة فى وجود إضاءة كافية التمييز بين نقطتين تبعدان عن بعضهما البعض بمسافة ٠,٢ مم أو أكثر كنقطتين منفصلتين ، فإذا قلت هذه المسافة عن٠,٢ مم تشاهدان كنقطة واحدة. وتعرف هذه المسافة بقدرة التمييز Resolving power للعين .

وإذا ما نظرنا إلى مسافة صغيرة بين نقط بمساعدة عدسة، أو جهاز به عدسات (مجهر) تكون هذه المسافة أكبر، ويمكن التدليل على ذلك بفحص صورة فى جريدة بعدسة مكبرة. وكلما زادت قوة التكبير ، زادت قدرتنا على مشاهدة تفاصيل أدق. وعند استخدام المجهر الضوئى (المركب) Light microscope (LM) حيث يتخلل الضوء العينة يمكن التكبير نحو ١٠٠٠ ضعف (1000 X) وبالتالى زيادة قدرة تمييز العين إلى نحو ٠,٠٠٠٢ مم .

خلال الدراسات المستمرة للحصول على تمييز أفضل اتضح أن قدرة تمييز المجهر لا تتوقف على عدد العدسات أو نوعيتها فقط ، ولكنها تعتمد أيضًا على طول موجات الضوء المستخدم فى الإضاءة، حيث يمكن للمجهر الضوئى أن يكبر الأجسام الدقيقة تكبيراً يسمح برؤيتها إذا كان الجسم المطلوب تكبيره أكبر من طول موجة الضوء الساقط عليه، وهذا ينطبق أيضًا على دقائق هذا الجسم، حيث يتحتم أن تكون هذه الدقائق أكبر من طول موجة الضوء المستخدم، وهذا لا يتأتى عند فحص الفيروسات مثلاً التى تقل فى أحجامها عن طول أقصر موجة من الموجات الضوئية، ولم يكن استعمال الضوء بالموجات الأقصر (الأزرق أو الفوق بنفسجى) كافيًا للخوض بعمق فى التراكيب الدقيقة، إلى أن اكتشف الإنسان فى العشرينيات من هذا القرن أن الإلكترونات النشطة (أجزاء من الذرة) تسلك فى الفراغ سلوك الضوء، إلا أن طول موجاتها أصغر بنحو ١٠٠,٠٠٠ مرة عن الضوء، وأكثر من ذلك اكتشف أن للمجال المغناطيسى تأثيرًا على الإلكترونات يماثل تأثير العدسات الزجاجية على الضوء المرئى.

تمكن العالم أرنست رسكا Ernst Ruska بجامعة برلين والذى نال جائزة نوبل عن أعماله عام ١٩٨٦ من الاستفادة من هذه الخصائص فى تصميم أول مجهر إلكترونى متخلل عام ١٩٣١ Transmission electron microscope (TEM) ولقد تطورت هذه الصناعة حتى أمكن حاليًا استخدام خمس عدسات كهرومغناطيسية Electromagnetic lenses فى

نظام التصوير تعطى قدرة تمييز تصل إلى نحو ٠,٣ نم* وقوة تكبير نحو مليون مرة. وعمومًا يجب أن يتمشى نظام البصريات (الإلكترونات) مع قدرة التمييز المطلوب توافرها للعينة، ويجب أن تكون قوة التكبير على الأقل مساوية لقدرة تمييز العين ، مقسومة على قدرة تمييز النظام المستخدم . (شكل ١١ - ١٥).

يستخدم المجهر ذو الضوء المنعكس Reflected light microscope (RLM) فى دراسة سطح العينة، وفى هذه الحالة أيضًا يكون طول موجة الضوء المستعمل لإضاءة العينة عائقًا للحصول على قدرة تمييزأفضل. وبالتبعية فقد اتجه التفكير إلى الإلكترونات كبديل أفضل من الضوء. عند تحميل العينة رأسيًا فى المجهر الإلكترونى المتخلل TEM إذا ارتطم الشعاع الإلكترونى بالسطح بزاوية صغيرة جدًا تنتج صورة لسطح العينة، ومع ذلك ولأسباب عديدة لم تستخدم هذه الطريقة بصفة عامة لدراسة الأسطح، وأمكن حديثًا فقط تطبيق هذه الطريقة بصورة مرضية فى بعض الدراسات الخاصة (شكل ١١ - ١٥) .

لقد أمكن بنجاح أكبر دراسة الأسطح باستخدام الشعاع المساح بدلاً من الشعاع الثابت مع نظام تصوير خاص - ويعرف فى هذه الحالة بالمجهر الضوئى المساح Scanning electron microscope (SEM) ، ولا يعرف على وجه الدقة من وضع الأسس الأولى للمجهر الضوئى المساح ، ومع ذلك فإن أول وصف نشر لجهاز يستخدم شعاعًا إلكترونيًا مساحًا للحصول على صورة للسطح قام به عالم الطبيعة الألمانى ماكس نول Max Knoll عام ١٩٣٥ ، وتزيد حاليًا قوة تكبير المجهر الضوئى المساح عن ١٦٠,٠٠٠ مرة ، وتبلغ قدرة التمييز ٤ نم (شكل ١١-١٥).

تعرف مجموعة الأسس المستخدمة مع كل من TEM و SEM بالفحص المجهرى الإلكترونى المساح المتخلل Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) ولقد وصفه أردين Mazred v. Ardenne للمرة الأولى عام ١٩٣٨ ، واستخدم أول جهاز تجارى جمع النوعين معًا عام ١٩٦٩ ، وبقوة تكبير ٦٠٠٠ إلى ١٠٠,٠٠٠ مرة ، وقدرة تمييز ٢٥ نم، وحاليًا تصل قدرة تمييز هذه الأجهزة المزدوجة إلى ١ نم ، وقوة تكبيرها ٥٠ إلى مليون مرة .

(*) ١ ميكرون (Micron) = ١ ميكرومتر (Micrometer) = $١٠^{-٣}$ مم - ١ نم (Nanometer) = $١٠^{-٦}$ مم = $١٠^{-٩}$ م .

(أ) (ب) (جـ)

شكل (١١-١٥) : مقارنة بين نـظم التقنية المستخدمة فـى : (أ) المجهر الضوئى LM والمجهر ذو الضوء المـنعكس RLM (قوة التكبير حوالى ١٠٠٠) . (ب) المجهر الإلكترونـى المتخلل TEM (قوة التكبير حـــوالـى مليون) . (جـ) المجهر الإلـكترونى المساح SEM (قوة التكبير حوالى ٢٠٠,٠٠٠) (شوتانس Schotanus - فيليبس).

المجهر الإلكترونى المتخلل Transmission electron microscope (TEM)

يتركب المجهر الإلكترونى المتخلل من ثلاثة مكونات رئيسية :

(أ) عمود بصرى إلكترونى Electron optical column

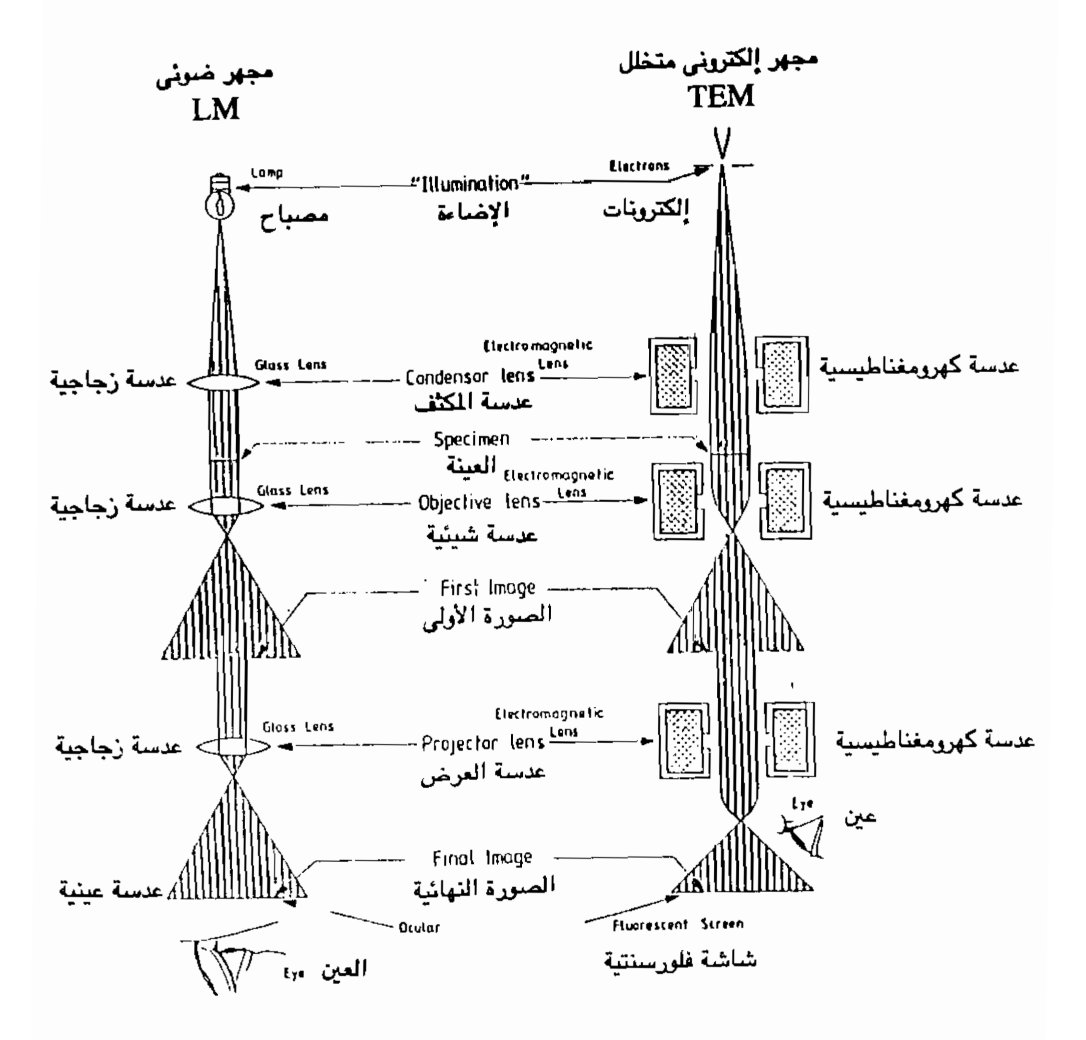
(ب) نظام تفريغ Vacuum system

(جـ) الإلكترونات اللازمة Necessary electronics

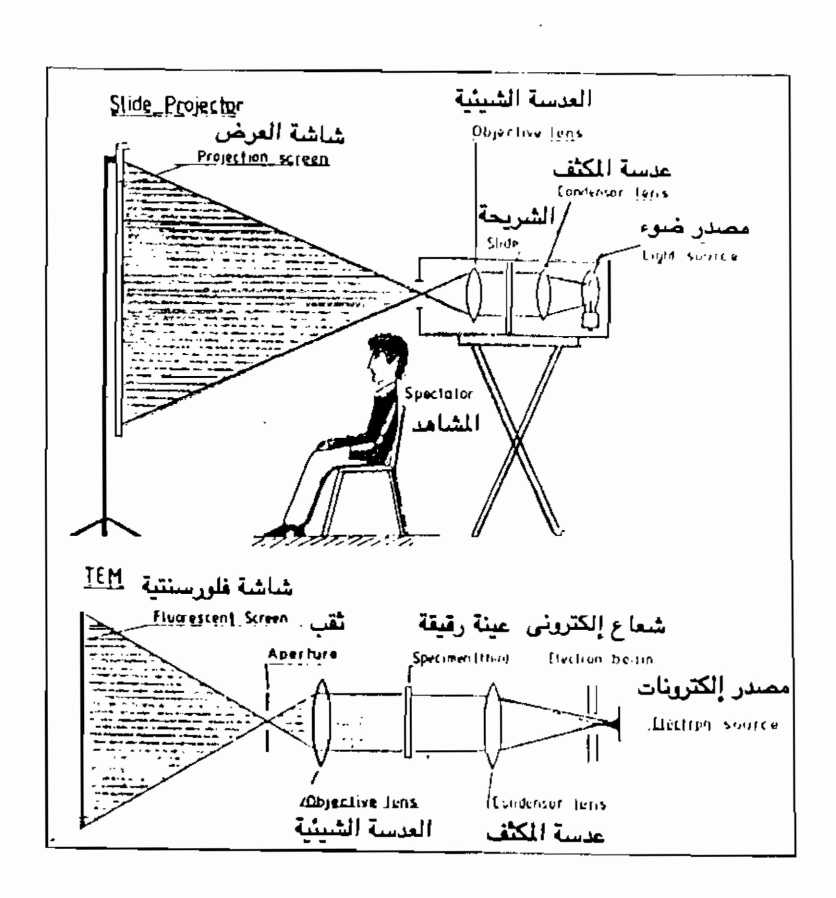
يعتبر العمود المكون الرئيسى بالمجهر الإلكترونى المتخلل ويكون على شاكلة مثيله بالمجهر الضوئى حيث تمر خلاله الإلكترونات والضوء، والفرق بينهما أن مصدر الضوء فى المجهر الإلكترونى هو مدفع إلكترونات Electron gun مزود به العمود، وحيث إن الإلكترونات تكون غير مرئية يتم اعتراضها بشاشة فلورسنتية Fluorescent screen حتى يمكن رؤية الصورة خلال نافذة فى حجرة العرض (شكل ١١-١٦) .

وثمة فرق جوهرى آخر أن العدسات الكهرومغناطيسية تختلف، عكس الحال بالنسبة للعدسات الزجاجية، بتغيير التيار خلال ملف العدسات وكذلك الطول البؤرى (الذى يحدد التكبير) بينما فى حالة المجهر الضوئى يلزم تغيير العدسات المستخدمة للحصول على قوة تكبير مختلفة .

يمكن لإيضاح أسس عمل المجهر الإلكترونى المتخلل عقد مقارنة بينه وبين عارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شكل ١١-١٧) حيث تقابل الشريحة الفيلمية العينة التى تفحص بالمجهر الإلكترونى المتخلل .



شكل (١١-١٦) : مسار أشعة الضوء فى المجهر الضوئى LM مقارنة بالإلكترونات فى المجهر الإلكترونى المتخلل TEM (شوتانس Schotanus- فيليبس).



شكل (١١-١٧) : مقارنـة بين المجهر الإلكترونى المـتخلل TEMوعارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شوتانس Schotanus- فيليبس).

يتركــب مــدفع الإلكتــرونات (شكل ١١-١٨) مــن قـطب سالب Cathode وفتيل Filament وما يعرف بالقطب الكهربائى ڤينلت Wehnelt electrode وتعرف هذه الأجزاء فى مجموعها بأسطوانة ڤينلت، إلى جانب قطب موجب Anode يكون الفتيل تنجستين على هيئة دبوس شعر يجرى تسخينه إلى نحو ٢٧٠٠° م وكلما ارتفعت درجة حرارة الفتيل، زاد الناتج من الإلكترونات بواسطة مدفع الإلكترونات، ولهذا الفتيل عمر تحده فترة زمنية معينة، وفى بعض المجاهر يستبدل الفتيل المعتاد (تنجستين على شكل دبوس الشعر) بنوع خاص من البلـلورات يتم تسخـينها، وبصفـة عامة كلما زادت كـمية الإلكترونـات المنبعثة مـن المصدر المستخدم ، كان قطر الحزمة الإلكترونية صغيرًا وهـذا يعطى تميزًا أفضل للعينة. عند توصيل قوة محركة كـهربائية موجبة عـالية جدًا (من ٢٠,٠٠٠ إلى عدة مئـات الألوف فولت) إلى القطب الموجب يمكن الحصـول على الإلكترونات من السحابة الإلكترونيـة حول الفتيل وبعد تجمعهـا على شكل حزمى بالـقطب الكهربائى ، تـنشط إلى سرعات تصل إلـى عدة مئات الألوف من الكيلو متـرات فى الثانية، وتمر خلال ثقب بمنتصف الـقطب الموجب عن طريق عدسات المكثف لتتخلل العينة (الرقيقة جدًا) والـعدسات المكبرة لتصطدم فى النهاية بالشاشة الفلورسنتية ، التى تحول الصورة الإلكترونية إلى صورة مرئية .

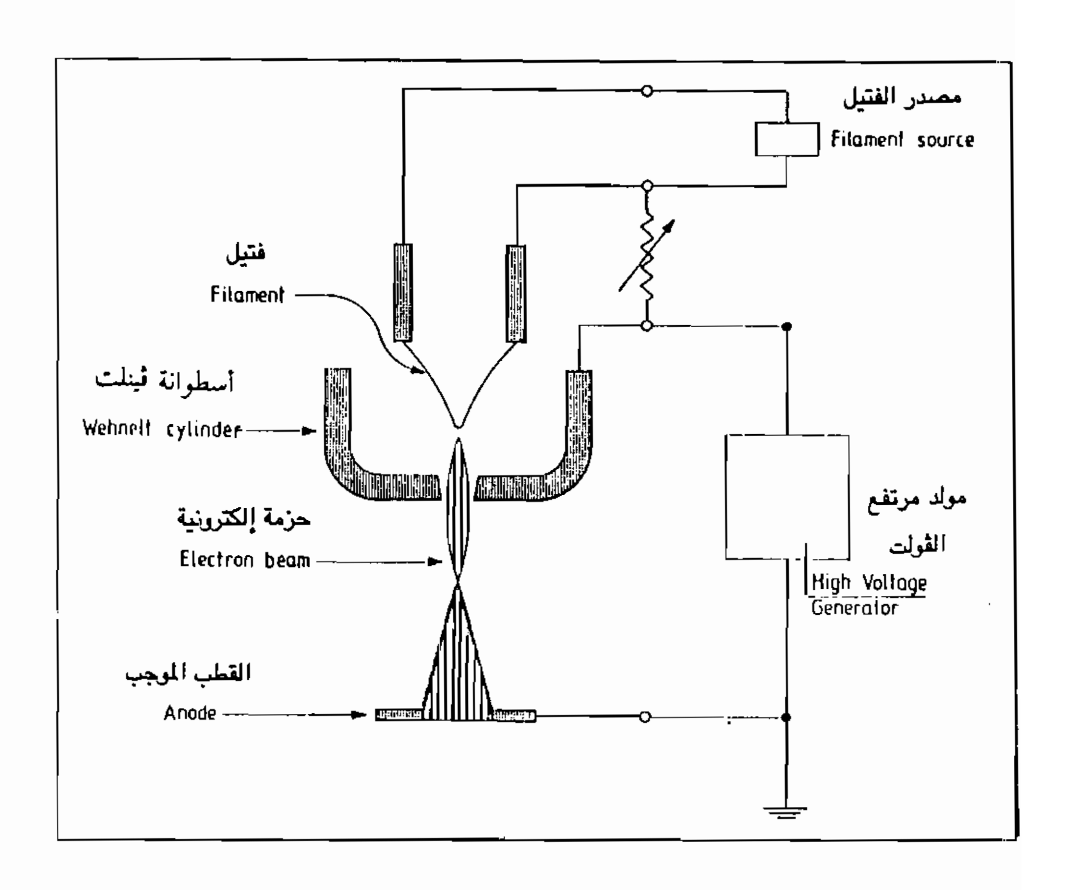
إذا لم تكن العينة رقيقة جدًا فإن الإلكتـرونات تقف ولا تتكون الصورة، وعادة لا يزيد سمك العينات المختبرة بالمجهر الإلكترونى المـتخلل عن نصف ميكرون، كما لا يزيد قطرها عادة عن ٣ مم، لذلـك كلما زادت سرعة الإلكتـرونات ، أو بمعنى آخر كلـما زادت سرعة القوة المحركة الكهربائية ، أمكن دراسة عينات أكثر سمكًا .

ماذا يحدث بالعينة أثناء قذفها بالإلكترونات ؟

عند مرور الإلكترونات خلال العينة تحدث الظواهر المتعددة التالية :

(١) تُمتص بـعض الإلكترونـات بسبب سمـك وتركيب العـينة، وهذه تزيـد من وضوح الفروق بالصورة .

(٢) تقل سرعة بعض الإلكترونات الأخرى نتيجة لاختلاف العناصر ، وهذه تعطى التقابل المظهرى Phase contrast بالصورة .



شكل (١١-١٨) : رسم تخطيطى لقطاع مستعرض لمدفع الإلكترونات (شوتانس Schotanus- فيليبس).

(٣) تنحرف الإلكترونات فى حالة العينات البللورية فى اتجاهات محددة نتيجة للتركيب الشبكى للعينة وهذا يعطى أنماط إنحراف متميزة للعينة .

(٤) تنعكس بعض الإلكترونات المرتطمة بالعينة (إلكترونات مبعثرة للخلف) .

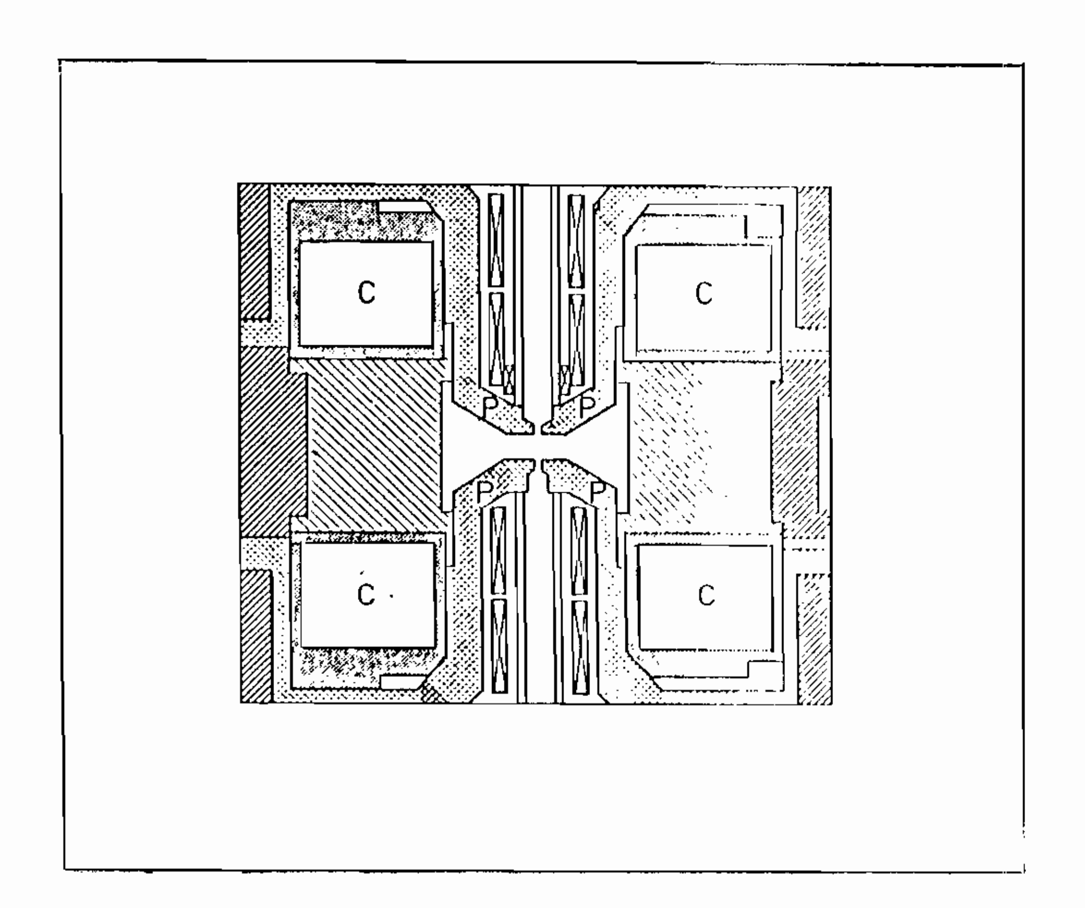
(٥) تقذف العينة ذاتها إلكترونات ثانوية .

(٦) تقذف العينة أشعة سينية ذات طاقة، وطول موجة، ترتبط بتركيب العناصر بالعينة .

(٧) تقذف العينة فوتونات (= ضوء) Cathodo luminescence .

تعزى الظاهرة الأولى والثانية إلى تكوين الصورة المعتادة بالمجهر الالكترونى المتخلل القياسى. ويمكن من خلال إضافة بعض المكونات إلي المجهر الاستفادة من الأربع ظواهر الآخيرة بشكل أو بآخر ؛ للحصول على أقصى قدر ممكن من المعلومات عن العينة، وعلى عكس ما قد يتوقع البعض فإن القذف الإلكترونى يمكن السيطرة عليه . وبالتالى لا يؤثر على العينة .

يوضح شكل (١١-١٩) قطاعًا مستعرضًا للتركيب الميكانيكى لعدسة كهرومغناطيسية . عند مرور تيار كهربائى خلال الملفات الكهربائية (C) ينتج مجال كهرومغناطيسى بين مايعرف بالقطع القطبية (أ) ، ويمكن تغيير قوة تكبير العدسة بتغيير التيار الكهربائى المار خلال الملف. ويعتبر ذلك الاختلاف الوحيد عن العدسة الزجاجية، وفيما عدا ذلك فسلوكهما متماثل ؛ حيث إن لهما نفس النمط من الزيغ (الانحراف) Aberration ويعبر الزيغ الكروى عن اختلاف التكبير فى المركز عن الحواف. والزيغ اللونى اختلاف تكبير العدسة باختلاف طول موجة الإلكترونات فى شعاع الإضاءة واللابؤرية Astigmatism حيث تكون صورة الدائرة بيضاوية الشكل .



شكل (١١-١٩) : قطاع مستعرض فى عدسة كهرومغناطيسية.
C : ملف كهربائى .
P : قطعة قطب
(شوتانس Schotanus - فيليبس).

ويعمل نظام عدسة المكثف على ضبط الحزمة الإلكترونية (صورة الفتيل) على العينة الجارى فحصها بالقدر الذى يناسب الغرض من الدراسة. وتتكون بالعدسة الشيئية كل من الصورة الإلكترونية، ونمط الانحراف (فى حالة العينة البللورية) . وبتغيير تكبير العدسة التى تلى العدسة الشيئية مباشرة يمكن تكبير أى من هاتين الصورتين ، وعرضها على الشاشة الفلورسنتية فى حجرة العرض بالعدسات الأخرى فى العمود .

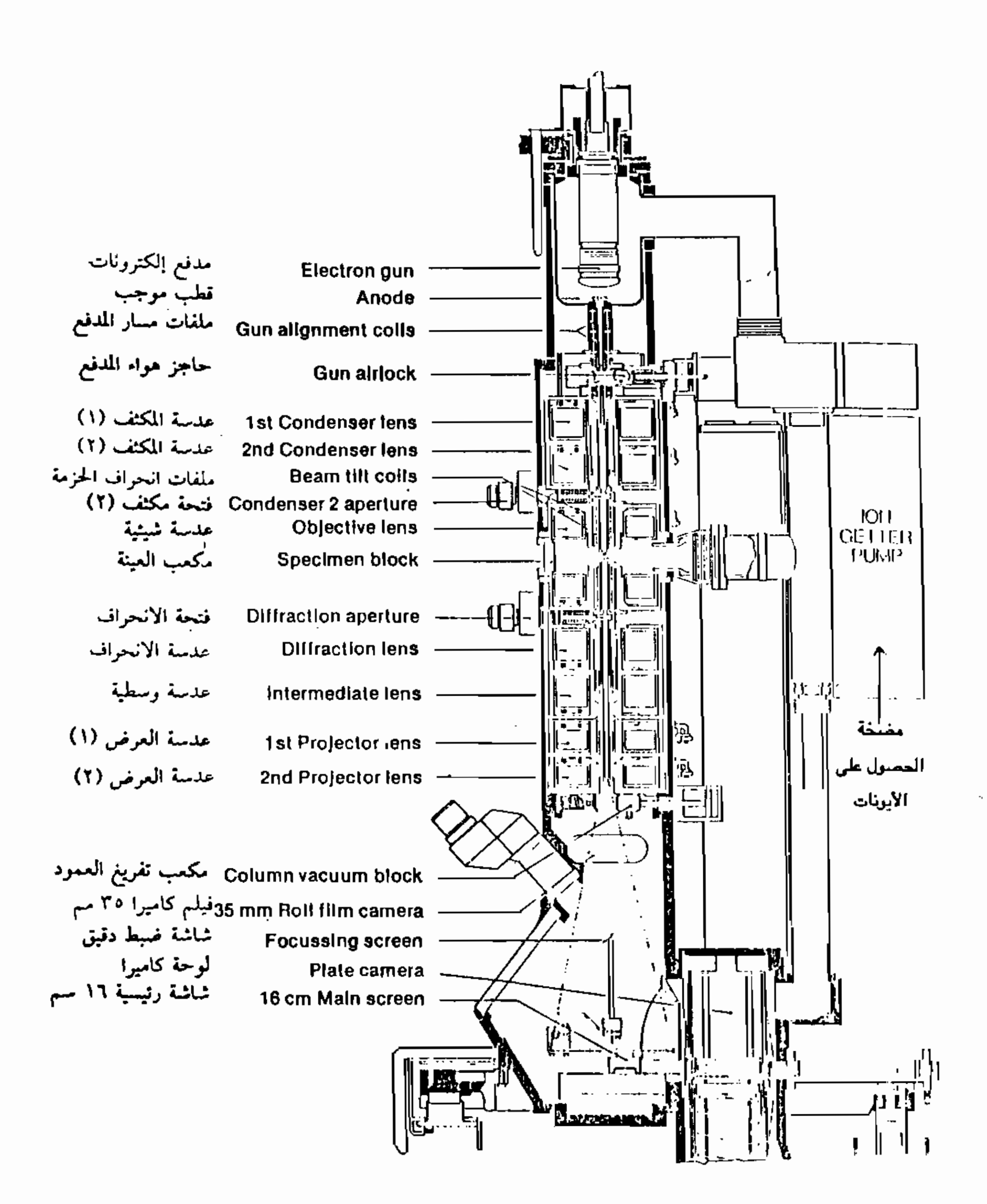
وعادة ما يعقب العدسة الشيئية أربع عدسات، وعدسة انحرافات، وعدسة وسطية، وعدستان للعرض ، وقد تزود العدسات بنظام للتبريد المائى لضمان درجة مرتفعة من الثبات والحصول على أعلى تكبير ممكن .

تمر الحزمة الإلكترونية من الفتيل إلى الشاشة الفلورسنتية خلال سلسلة من الفتحات مختلفة الأقطار، ويجب أن تمنع مرور الإلكترونات التى لا تفيد فى عملية تكوين الصورة. ويمكن من خلال ماسك خاص يحمل أربع فتحات مختلفة التحكم من خارج العمود وتبعًا للظروف المعينة فى اختيار قطر فتحة عدسة المكثف، والعدسة الشيئية، وعدسة الانحراف .

مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يمكن مشاهدة الصورة على الشاشة الفلورسنتية من خلال نوافذ كبيرة فى غرفة العرض. وعند مشاهدة التفاصيل الدقيقة جدًا للعينة، أو عندما تتطلب الصورة ضبطًا دقيقًا يمكن إعتراض الحزمة بشاشة ضبط خاصة ذات حبيبات دقيقة جدًا، وفى هذه الحالة تشاهد الشاشة بواسطة مجهر بسيط Binocular قوة (12 X) عالى الجودة .

يفضل كما هو الحال فى أى من فروع العلوم الأخرى الاحتفاظ بسجل مستديم لما تشاهده العين، وفى واقع الأمر لا يتطلب الأمر أى حيل خاصة لإجراء هذا الأمر، فالإلكترونات لها نفس تأثير الضوء على المادة الفوتوغرافية وبالتالى للحصول على ما يعرف بالصورة الإلكترونية الدقيقة لا يتطلب الأمر سوى إعداد موضع أسفل عدسة العرض النهائية يوضع به حاملة Cassette بها عدد من اللوحات أو الأفلام الفوتوغرافية، وتقع هذه الحاملة أسفل الشاشة الفلورسنتية. يمكن تسجيل الصورة بإمالة الشاشة بعيدًا، وفى بعض أنواع المجهر المتخلل يمكن وضع فيلم ٣٥ مم بالحاملة. يوضح الشكل (١١-٢٠) قطاعًا عرضيًا بالعمود لمجهر إلكترونى متخلل حديث .



شكل (١١-٢٠) : قطاع عرضي لعمود مجهر إلكتروني متخلل حديث.
(شوتانس Schotanus - فيليبس).

المشاهدة من خلال شاشة تلفزيون Observation via T.V. screen

يمكن أيضًا مشاهدة الصورة باستعمال شاشة فلورسنتية شفافة (من خارج العمود المفرغ) بواسطة كاميرا تلفزيونية تنقل الصورة إلى عارض تلفزيونى T.V. monitor - ومما لا شك فيه أن هذه الطريقة تكون أفضل إذا أمكن مشاهدة الشاشة الفلورسنتية خلال نافذة زجاجية دون إضافة كاميرا تلفزيونية .

تتضح أهمية المشاهدة التلفزيونية فى التدريس ، وكذلك لتسجيل الوظائف التى تتضمن الحركة ؛ حيث تسجل على شريط فيديو .

التفريغ Vacuum

كما سلف الذكر، يقتصر تصرف الإلكترونات مثل الضوء عند استخدامها تحت تفريغ، لذلك يلزم تفريغ كل العمود من القمة إلى القاعدة، ويتم التفريغ بكفاءة بواسطة مجموعات من المضخات المختلفة ، كذلك يتم التخلص من بخار الماء الذى ينتج دائمًا بالعمود عند استبدال العينات بواسطة مضخة تبريد ، وتحاط منطقة العينة بمكعب من النيتروجين السائل المبرد .

يزود العمود بعدد من حاجز الهواء، وصمامات فصل كهرومغناطيسية محكمة لتجنب إخلاء كل العمود من وقت لآخر عقب استبدال العينة، أو الخامات الفوتوغرافية، أو الفتيل.

يكون نظام التفريغ فى المجاهر الإلكترونية المتخللة الحديثة محكمًا ذاتيًا ، ويمكن متابعة التفريغ على الجهاز بصورة مستمرة لتجنب أى خطأ قد يحدث خلال الفحص .

الإلكترونيات The electronics

لا جدال فى أن الحصول على النتائج الفائقة للمجهر الإلكترونى المتخلل الحالى يتطلب ثبات الفولت والتيار الكهربى المار خلال العدسات، لذلك تشتمل غرفة القوة الكهربية للمجهر الإلكترونى المتخلل الحديث على عدد ملموس من المصادر، وتيار لا ينحرف بأكثر من جزء من المليون من القيمة المطلوبة للدراسة، من أجل ذلك لابد من توافر دوائر متطورة يمكن من خلالها الحصول على مثل هذا الثبات، ولا شك أن التقنية الإلكترونية الرقمية

Digital المتاحة الآن والتقنية القائمـة على المعالجة فائقة الدقة Microprocessorتلعب دوراً حيويًا فـى هذا الصدد، ولقـد ساعد ذلك علـى تقليل مـفاتيح التـحكم ، كما أتـاح فرصة الكشف عن ظروف التشغيل مثل نظام التفريغ فى أى لحظة من خلال مفاتيح خاصة .

توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

لا يكتفى من يستخدم المجهر الإلكترونى المتـخلل بحركة العينة فى الاتجاه الأفقى فقط، حيث يرغب الباحث فـى تكوين صورة مجسمة للعينة، لذلك فـإنه يحتاج إلى إمالة ودوران العينة. عند توجيه عينة (بللورية) فى وضـع معين مع الشعاع الإلكترونى للحصول على نمط انحراف مـعين، يتطلب الأمـر توجيه آخر فـى اتجاه متعامـد مع التوجيه الأول، مـثل ذلك وغيرها من المتـطلبات كالفحص أثناء تـسخين، أو تبريد، أو ضغوط ممكنًا بـواسطة مقياس زاوية Goniometer يوجد حول الـعدسة الشيئية، ويـوفر مقياس الزاوية الحـركة فى الاتجاه الأفقى أساسًا (من خلال قضيبـين على جانبى العمود يتحكمان فى حركـة العينة) كما توجد مجموعة أخرى من القضبان حول العينة مصممة بطريقة تتيح الحركة فى بقية الاتجاهات .

استخدام المجهر الإلكترونى المتخلل وإعداد العينة

Application and specimen preparation

يمكن استخدام المجهر الإلكترونى المتخلل فى أي مـن فروع العلوم والتكنولوجيا المختلفة إذا ما تطلب الأمر دراسة التركيب الداخلى للعينات على المستوى الذرى، على فرض إمكانية إعـدادها بصورة ثابتة ودقيقة (بـقطر حوالى ٣ مم) تسمح بوضعها فى عمـود المجهر المفرغ، ورقيقة بدرجة كـافية (أقل من ٥, ٠ ميكرومتـر) تسمح بمرور الإلكترونات ولهـا القدرة على مقاومة كـل من التفريغ وتـأثير الشعاع الإلـكترونى، وتشيـر الأعداد الكبيرة مـن الأبحاث المنشورة التى استعانت بالمجهر الإلكترونى إلى مدى أهميته للدارسين فى المجالات البيولوجية والتكنولوجية المختلفة .

كل فرع من الدراسة له طرق متخصصة لتجهيز العينة بالصورة الملائمة للفحص بالمجهر الإلكترونى، فعلم المعادن Metallurgy له طرقه الخاصة، وفى عـلم البيولوجى Biology تعامل الأنسجة بطرق خاصة، ويمكن إيجاز خطوات تجهيز العينة للفحص فيما يلى :

تعامل العينة بالطريقة الكيميائية المناسبة للتخلص من الماء وحفظ الأنسجة بصورة تماثل حالتها الطبيعية بقدر الإمكان، ثم توضع فى كبسولة چيلاتين (١٠ مم × ٥ مم قطر) تملأ بالراتنجات لتكتسب صلابة، تؤخذ من العينة بعد ذلك قطاعات بمتوسط سمك ٠,٥ ميكرومتر ، بواسطة ميكروتوم فائق Ultra microtome مزود بسكين زجاجي أو ماسى .

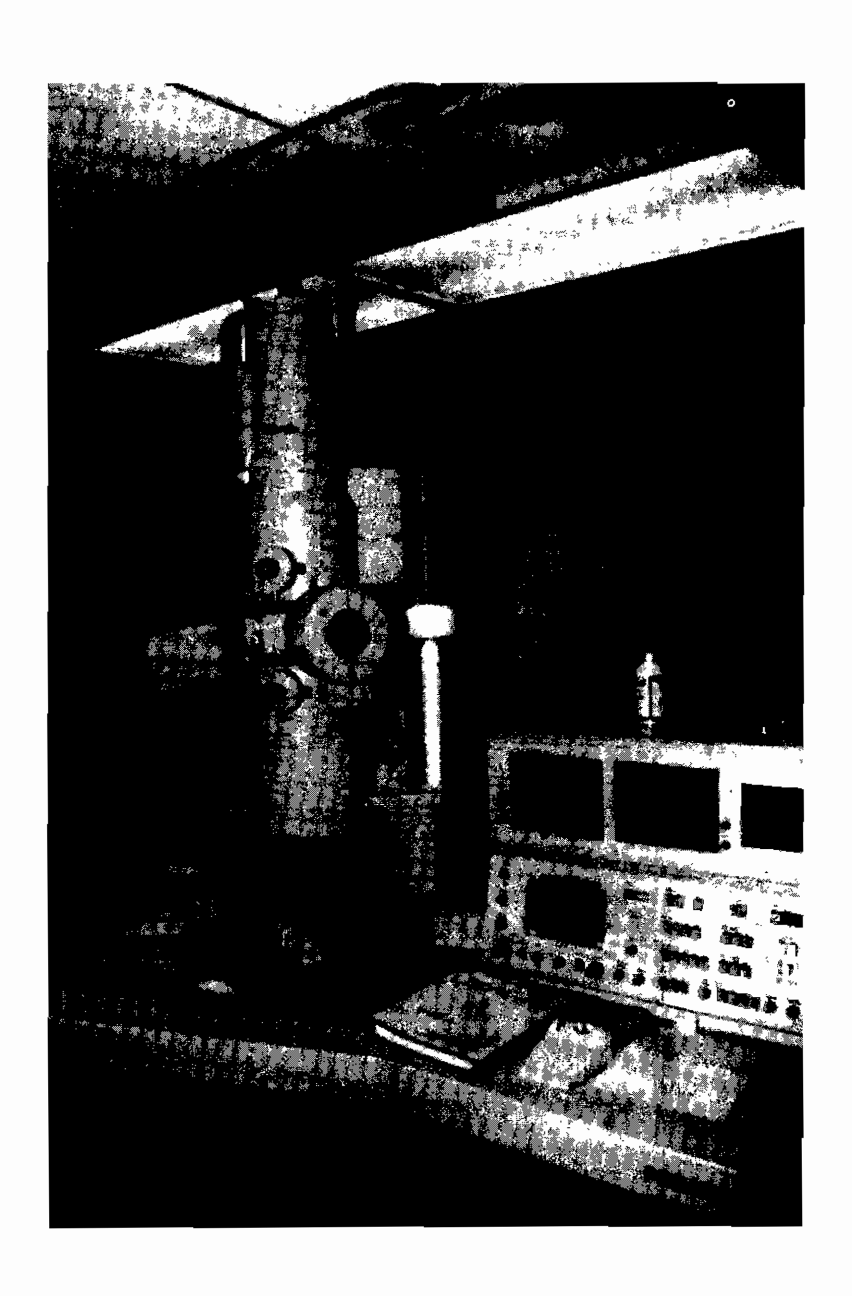
توضع القطاعات الصغيرة التى يتم الحصول عليها على حامل عينة - عادة شبكة نحاسية خاصة قطرها ٣ مم ، سبق طلائها بكربون عديم التركيب بسمك ٠,١ ميكرومتر .

ويوضح الشكل (١١-٢١) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكترونى المتخلل .

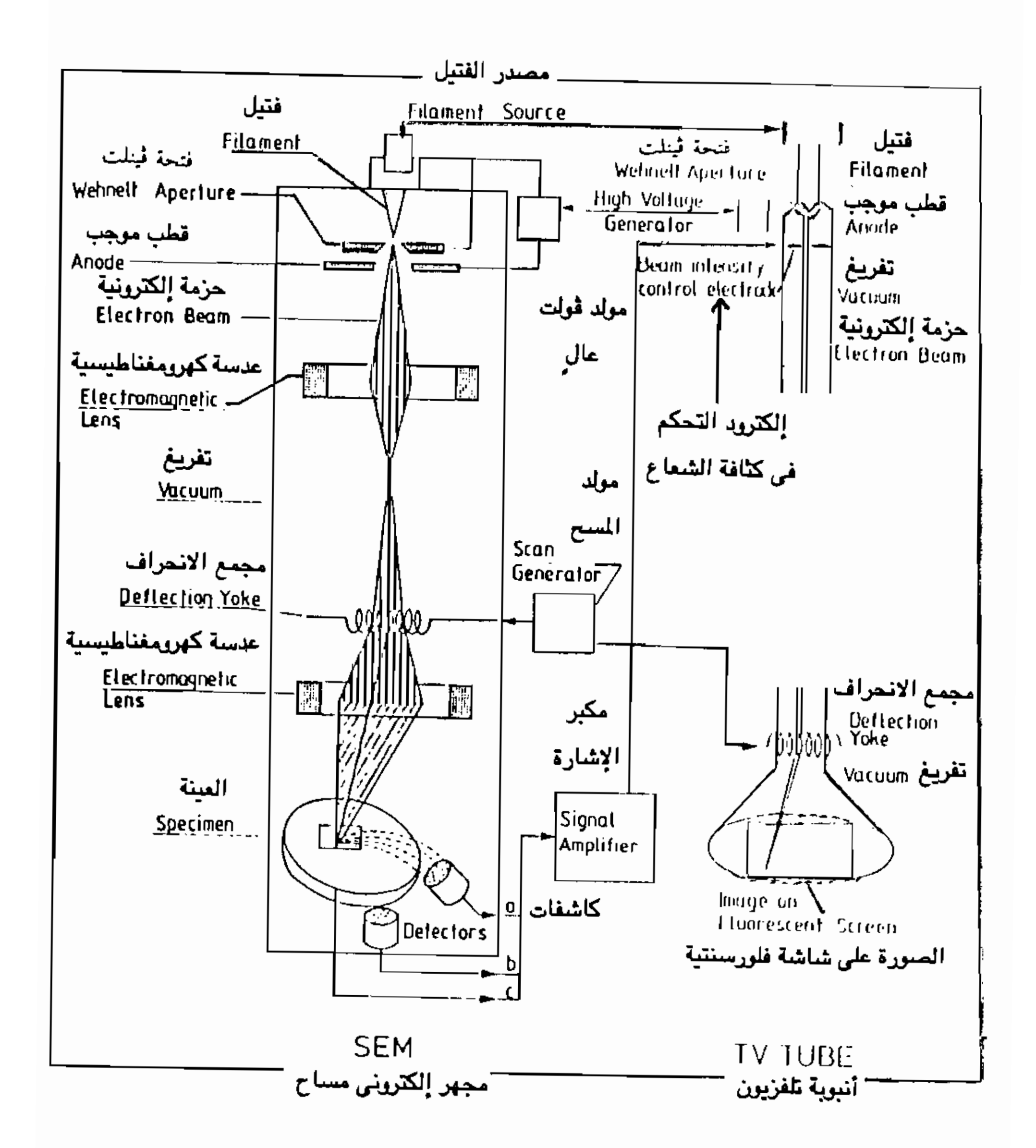
المجهر الإلكترونى المساح Scanning electron microscope (SEM)

تجتمع كافة مكونات المجهر الإلكترونى المساح عادة فى ذات الوحدة، ويوجد العمود البصرى الإلكترونى ووحدات التحكم الإلكترونية بالقمة ليسهل تداولهما ويوجد أسفل المنضدة نظام التفريغ، ومولد الڤولت العالى، والمصادر الرئيسية للقوة، ومثبت التيار الكهربائى .

وكما سبق الذكر، يماثل المجهر الإلكترونى المساح مع بعض التحفظات المجهر ذو الضوء المنعكس، ويوضح شكل (١١-٢٢) مقارنة أخرى، حيث يتضح أن تشغيل المجهر الإلكترونى المساح يماثل إلى حد كبير أنبوبة التشغيل المزود بها التليفزيون، حيث يوجد فى كلا النظامين مدفع إلكترونات يماثل ذلك المزود به المجهر الإلكترونى المتخلل ، الذى يعطى شعاعًا إلكترونيًا، وفى حالة المجهر الإلكترونى المساح يرتطم هذا الشعاع بالعينة، وخلاف ما يحدث من ظواهر أخرى، تقذف العينة إلكترونات ثانوية، وفى حالة أنبوبة التلفزيون يرتطم الشعاع بشاشة فلورسنتية التى بدورها تقذف فوتونات (= ضوء). يمسح الشعاع الإلكترونى مساحة صغيرة من سطح العينة خطا بعد خط، متزامنًا مع الشعاع الإلكترونى فى أنبوبة التلفزيون، ويقوم الكاشف Detector بالتقاط الإلكترونات الثانوية التى تتولد خلال هذه العملية بواسطة كل نقطة من العينة على حدة، وتتحكم الإشارة الصادرة عن الكاشف فى كثافة الشعاع فى أنبوبة التلفزيون، وبالتالى تكون كمية الضوء التى تقذفها كل نقطة من شاشة التلفزيون متناسبة مع عدد الإلكترونات من النقطة المقابلة على سطح العينة، وبالتالى تظهر الصورة الممثلة لسطح العينة على شاشة التلفزيون خطًا بعد خط .



شكل (١١-٢١) : المجهر الإلكترونى المتخلل.



شكل (١١ - ٢٢) : مقارنة بين نظام التشغيل فى المجهر الإلكترونى المساح

وأنبوبة التليفزيون (شوتانس Schotanus - فيليبس)

يجرى التسـجيل بتصوير شاشـة التلفزيون، حيث يـفتح غالق Shutter كاميرا عادية عندما تبدأ عملية المسح ويقفل عقب كتابة آخر خط .

وفيمـا يلى وصف لمختـلف أجزاء المجهر الإلكـترونى المساح ، وبـعض أوجه التقـنية الخاصة به .

مدفع الإلكترونات Electron gun

يتركـب مدفع الإلكترونـات من فتيل، وأسـطوانة قلنسوة تماثلان نـظيريهما فـى المجهر الإلكترونى المتخلل، كذلك لا يختلف الأسـاس الذى يقوم عليه نظام الإضاءة حيث يتركب من مدفع إلكترونات + قطب موجب + عدسات المكثف، تقوم العدسة النهائية بضبط الحزمة على سطح العينة المطلوب فحصها .

وتتمثل أهم الفروق فيما يأتى :

(١) الحزمة ليسـت ساكنة Static كما فى المجهر الإلكترونى المـتخلل ؛ حيث تقوم الحزمة بمسح جزء متناهٍ فى الصغر من سطح العينـة بمساعدة مجال كهرومغناطيسى ، ناتج عن ملفات مسح يحكمها ما يعرف بمولد المسح Scan generator .

(٢) فولت التنشيط أكثر انخفاضًا فى المجهر الإلكـترونى المساح عنه فى المجهر الإلكترونى المتخلل ؛ حيث يتراوح فى الأول ما بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ فولت .

والسؤال الآن، ماذا يحدث بالعينة عند انطلاق الإلكترونات ؟

سبق مناقشة الظواهـر المتعددة التى تصاحب قذف العينة بالإلكـترونات ، عند استخدام المجهر الإلكـترونى المتخلل، وعمـومًا تلاحظ الظواهر الخمس الـتالية عند استعـمال المجهر الإلكترونى المساح :

(١) ينبعث عن العينة ذاتها ما يعرف بالإلكترونات الثانوية .

(٢) تنعكس بعض الإلكترونات (الإلكترونات التى تتشتت إلى الخلف) .

(٣) تمتص العينة إلكترونات .

(٤) ينبعث عن العينة أشعة سينية .

(٥) ينبعث عن العينة أحيانًا فوتونات (= ضوء) .

أضف إلـى ذلك ظاهرة سـادسة هى إنتـاج ما يعـرف بالإلكتـرونات الثاقـبة Auger electrons تحت تأثر الأشعة السينية المنبعثة .

تتداخل كـل هذه الظواهر معًا ويعـتمد كل منها إلـى حد ما على التضـاريس، والعدد الذرى، والحالـة الكيميائـية للعيـنة، ويعتمد عـدد الإلكترونات الـتى تتشتت إلـى الخلف، والإلكتـرونات الثانويـة المنبعثـة ، والإلكترونات الـتى تمتص عـند كل نقطـة بالعينـة على تضاريس الـعينة بدرجة أكبر مـن أية خاصية أخرى، ولذلـك السبب تستغل هـذه الظواهر الثلاث بصورة أساسية لتصوير سطح العينة .

الكشف عن الإلكترونات Electron detection

تعمل كافة الكاشـفات عن الإلكترونات التى تتشتت إلى الخلف والإلـكترونات الثانوية التى تنبعث من العينة على أسس واحدة حيث تصدم الإلكترونات شاشة فلورسنتية، ونتيجة لذلك ينبـعث عن الشاشة فوتونـات وهذه يتم الكشف عنـها وتحويلها إلى إشارة كـهربائية بواسـطة أنبوبـة تقوية الـضوء Photomultiplier tube . عنـد وضع قطـب كهربـائى Electrode موجب الـشحن علـى هيئة قـفص حول مقـدمة الكاشـف فإن كفاءة الـكاشف للإلكترونات الثانوية تكون أفضل .

التكبير والإظهار Magnification and resolution

يجرى تحديد التكبير فى المجهر الإلكترونى المساح بواسطة الدائرة الإلكترونية التى تمسح الحزمة فوق العينة (وفى ذات الـوقت فوق الشاشة الفلورسنتية لأنبوبة التـلفزيون حيث تظهر الصورة) وفوق مقطع أنبوبة التلفزيون .

$$\text{تكبير المجهر الإلكترونى المساح} = \frac{\text{طول أحد الخطوط (التى تكتبها) الحزمة الإلكترونية على شاشة التلفزيون (عرض صورة التلفزيون)}}{\text{طول أحد (مسارات) الحزمة الإلكترونية على العينة}}$$

يتحدد إظهار المجهر الإلـكترونى المساح بصورة أساسية بواسطة قـطر الحزمة على سطح العينة، ومع ذلك يعتمد الإظهار من الناحية العـملية على خصائص العينة، وتقنية إعدادها،

وعلى عديـد من القياسات الجـهازية مثل كثـافة الحزمة، والفولت المنشط، وسـرعة المسح، والمسافة بـين آخر عدسة والعينـة (تعرف عادة بمسافـة الشغل Working distance) وزاوية سطح العينة مع الكاشف، ويمكن تحت الظروف المثلى الحصول على إظهار قدره ٤ نم .

مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يزود المجهر الإلكترونى المساح عادة بعارضين للصورة Image monitor يشاهد الباحث الصـورة من خـلال أحدهـما، أما الآخـر ويعـرف عادة بالـعارض عـالى الإظـهار High resolution monitor فيـزود بكاميرا تـصوير عادية ذات فـيلم ٣٥ مم أو ٧٠ مم أو طراز مناسب من كاميرا بولارويد Polaroid إذا تطلب الأمر الحصول على صور فورية .

معاملة الصورة Image treatment

لما كان الحصول على الصـورة فى المجهر الإلكترونى المساح يتم بالكـامل إلكترونيًا فإن من الممكـن معاملتهـا بمختلف الأسالـيب الإلكترونيـة الحديثة، والتى تـشتمل على تـعظيم الاختلافات، والتعاكس (الأسـود يصير أبيض) ومزج الصور من كاشفات مخـتلفة، وتحليل الصورة، واسـتخراج صورة أحـد الكاشفـات، وبالتالى يمـكن الاستفـادة من مختـلف هذه التقنيات التى تناسب الحصول على أفضل البيانات الممكنة من العينة .

التفريغ Vacuum

يجرى فـى المجهر الإلكـترونى المساح، بـصفة عامـة، الحصول على تـفريغ منـخفض ونظيف بمساعدة مضخة قبل تفريغ رحوية ومضخة انتشار زيتية أو ما يعرف بالمضخة التربينية الجزيئية .

توفر هذه التوافيق أيضًا فترة كافية لتغيير العينة والفتيل والفتحة بصورة مرضية (أقل من دقيقـتين) دون الحاجة إلى اسـتخدام حاجز هـواء، وكما هو الحـال فى المجهر الإلكـترونى المتخلل فإن نظم التفريغ فى المجهر الإلكـترونى المساح تقع تحت تحكم ذاتى تام ومؤمنة ضد أعطال التشغيل .

الإلكترونيات Electronics

من البديهى أن المجهر الإلكترونى المساح مثل المجهر الإلكترونى المتخلل من حيث حاجته إلى ثبات الفولت والتيار اللازمين لمدفع الإلكترونات وعدسات المكثف للحصول على أفضل تمييز، وبالمثل يلزم إحكام ثبات الدائرة الإلكترونية المصاحبة للكاشفات بدقة بالغة، فالحال هنا يماثل المجهر الإلكترونى المتخلل حيث لا يسمح بالتجاوز بجزء فى المليون .

توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

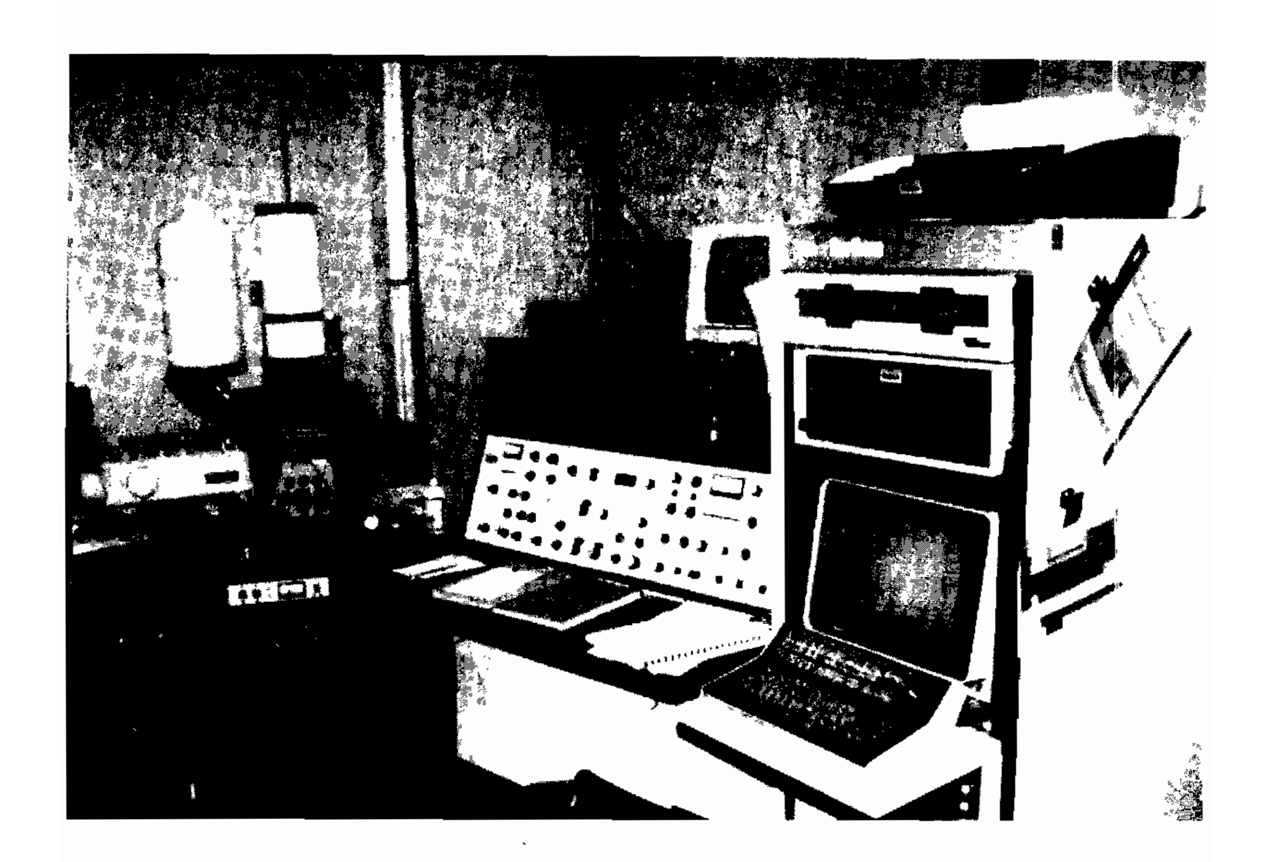
تعتمد نوعية الصورة بالمجهر الإلكترونى المساح على توجيه وبعد العينة بالنسبة للكاشفات الإلكترونية، لذلك يراعى فى المجهر الإلكترونى المساح حاليًا حرية حركة العينة فى الاتجاهين الأفقى والرأسى كذلك إمكانية دورانها وإمالتها تبعًا للحاجة، وعادة ما يكون حجم العينة فى المجهر الإلكترونى المساح أكبر من تلك بالمجهر الإلكترونى المتخلل، حيث يمكن استخدام عينات يصل حجمها إلى ٦٥ × ٦٥ × ٥٠ مم، وقد تضيف بعض المصانع إمكانية فحص العينة تحت تبريد أو تسخين أو تعريضها للشد .

استخدام المجهر الإلكترونى المساح وإعداد العينة
Application and specimen preparation

يستخدم المجهر الإلكترونى المساح فى عديد من فروع العلم والتكنولوجيا عندما تكون هناك حاجة إلى دراسة سطح العينة، وتحد القيمة الشرائية للجهاز من انتشار استخدامه .

يمكن فحص أى عينة كما هى بالمجهر الإلكترونى المساح عقب التخلص مما بها من مكونات متطايرة مثل الماء، وإمكانية فحص العينات بحالها له أهمية عظيمة فى حالات خاصة كما فى الأمور الشرعية، ومع ذلك يتطلب الحصول على ناتج أفضل من الإلكترونات وبالتبعية صورة أكثر دقة إضافة طلاء معدنى (عادة ذهب) رقيق للغاية (١ نم) وعادة ما يزود المجهر برشاش طلاء Sputter coater لهذا الغرض .

ويوضح الشكل (١١-٢٣) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكترونى المساح .



Hitachi Scanning Electron Microscope (SEM)

شكل (١١-٢٣) : المجهر الإلكترونى المساح.

الفحص المجهرى الإلكترونى المساح المتخلل
Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)

عندما تكون العينة فى المجهر الإلكترونى المساح شفافة بدرجة تكفى للإلكترونات أن تتخللها فمن الممكن تجميع هذه الإلكترونات بكاشف إلكترونات متخللة يوضع فى مكان مناسب، يعرف هذا الاتحاد بين أسلوبى تقنية المجهر الإلكترونى المساح والمجهر الإلكترونى المتخلل بالفحص المجهرى الإلكترونى المساح المتخلل STEM .

يمكن الحصول على نتائج مماثلة عندما يسمح للحزمة الإلكترونية فى المجهر الإلكترونى المتخلل أن تمسح العينة ويتزامن مع ذلك حزمة إلكترونية فى أنبوبة تلفزيون كما هو الحال فى المجهر الإلكترونى المساح، ويحمل أسفل عدسة العارض النهائية كاشفًا إلكترونيًا متخللاً، ويمكن حاليًا تزويد معظم المجاهر الإلكترونية المتخللة بهذه الإمكانية سواء كجزء إضافى أو جزء أساسى داخل المجهر، ويمكن لهذه التقنية التكبير حتى مليون ضعف وبقوة تمييز ١ نم .

ولقد أمكن الاستفادة من الإلكترونات التى تتشتت إلى الخلف ، وكذلك الإلكترونات الثانوية التى تنبعث أثناء قذف العينة للحصول على معلومات أكثر عن العينة التى تفحص بالمجهر الإلكترونى المتخلل ، حيث يوضع كاشف إلكترونى من النوع الرقيق جدًا شبه الموصل أسفل القطب العلوى للشيئية للحصول على صورة الإلكترونات التى تتشتت للخلف لسطح العينة على عارض التلفزيون ، ويتم توجيه الإلكترونات الثانوية إلى الكاشف من خلال ثقب فى القطب أعلى العدسة الشيئية، بإضافة فولت موجب لقطب كهربائى أمام الكاشف الإلكترونى مباشرة الذى يمكن تحميله على العمود البصرى الإلكترونى وبالتالى نكون قد أضفنا إمكانيات المجهر الإلكترونى المساح إلى المجهر الإلكترونى المتخلل ، والحصول على معلومات عن العينة تشمل دقائق تركيبها الداخلى ، وكذلك السطح .

تجهيز العينات Tissue preparation

يقتضى تجهيز النسيج للفحص بالمجهر الإلكترونى مجموعة من الخطوات المتتالية تضمن التثبيت Fixing حتى تكتسب الأنسجة صلابة وقدرة على الحفظ ثم التجفيف Dehydrating ثم التشرب Infiltrating بمادة يمكن أن تتصلب بعد ذلك لتوفر مادة مناسبة

لعمل قطاعات رقيقة. ومن الأمور ذات الأهمية القصوى الحفاظ على التفاصيل الدقيقة للنسيج فى حالة أقرب ما تكون للنسيج الحى .

الحصول على العينات Obtaining material

الحصول على العينة أولى خطوات تجهيز النسيج للفحص المجهرى، ويتطلب ذلك اختيار المصدر المناسب للدراسة المطلوبة والقائم على طبيعة المادة والخطوات المزمع إجراؤها، ومن النقاط الواجب مراعاتها سرعة إجراء عملية التثبيت بمجرد أخذ العينة بقدر الإمكان حتى لا يتأثر مظهر التركيب المجهرى للنسيج .

التثبيت Fixation

أفضل محلول تثبيت لنسيج معين هو بطبيعة الحال ذلك الذى يحفظ الأنسجة تحت الدراسة على أكمل وجه، والمشكلة هى تحديد هذا المحلول حيث إنها عملية معقدة للغاية، وتتطلب جهدًا فائقًا لكثرة المتغيرات التى تحكمها مثل اختيار الجوهر المثبت، ودرجة الحموضة، ودرجة الحرارة، والفترة اللازمة وغير ذلك من الظروف المصاحبة لإجراء عملية التثبيت، ولا شك أن لنتائج الباحثين السابقين أهميتها فى هذا الصدد ولكن يبقى على الباحث ذاته تحديد الظروف اللازمة لعينته بالذات .

يستخدم رابع أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide (OsO_4) مع المحلول المنظم Acetate - veronal buffer بكثرة مع المجهر الإلكترونى أكثر من أى مثبت آخر، وإن تعددت المحاليل المستخدمة حديثًا وينصح عادة بمراعاة درجة الحموضة عند ٧,٣ إلى ٧,٥ حيث تؤدى حموضة الوسط إلى ظهور الشوائب فى التحضير، وقد يستخدم البعض أكثر من مثبت على التوالى كاستخدام الدهيدات معينة مثل الجلوتارالدهيد Glutaraldehyde عقب رابع أكسيد الأوزميوم حيث يعطى نتائج تثبيت أفضل .

تجرى عملية التثبيت عادة قريبًا من درجة الصفر المئوى، حيث تساعد درجة الحرارة المنخفضة على زيادة حجم الجزء من العينة الذى يتم تثبيته كما تقلل من تسرب المكونات الخلوية أثناء التثبيت .

تحدَّد الفترة اللازمة لإجراء التثبيت بالمواءمة بين إتمام التثبيت من جهة وتسرب المكونات الخلوية مــن جهة أخرى، لذلك يفــضل أن تكون الفتــرة قصيرة ما أمكن، وعــمومًا تتراوح الفترة المتبعة ما بين ٣٠ دقيقة إلى ساعتين تبعًا لحجم وكثافة العينة .

المحاليل المثبتة Fixatives

(١) مثبت بــاليد Palade's fixative وهو عبــارة عن محلول منــظم من ١ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم، وقد شاع استخدامه لسنين عديدة بعد استعماله لأول مرة عام ١٩٥٢، ويعتبر الأساس لكثير من المحاليل التالية له، ويتركب من :

Buffer stock solution (0.28 M)	
Sodium veronal (sodium barbital)	2.88 gm.
Sodium acetate (anhydrous)	1.15 gm.
Water to make	100 ml.
0.1 N HCl	
Concentrated HCl (36 % , 11.6 M)	8.6 ml.
Water to make	1 liter
Stock OsO_4 (2 %)	
Crystalline OsO4	2 gm.
Water to make	100 ml.

يذوب رابع أكسيد الأوزميوم ببطء عند درجة حرارة الغرفة، لذلك يلزم تسخين الماء إلى درجة حرارة ٦٠° م أو أكثر حتى تذوب الــبللورات وتسرع من تكوين المحلــول، كما يساعد الرج بشدة أيضًا، وقد يتوفر رابع أكسيد الأوزميوم كمحلول ٢ ٪ فى أنابيب زجاجية (٥ مل) محكمة الغلق، يحفظ هذا المحــلول على درجة حرارة الغرفة، أو عند ٤° م، وقد يتغير لون المحلول مع الوقت، عندئذ يستبدل بغيره .

لإعداد مثبت بــاليد تضــبط درجــة الحــموضة بالمحــلول المنظم عند المســتوى المطلوب (عــادة ٦,٨ - ٧,٦) بإضــافــة حجــم مــن 0.1 N HCl إلى حجــم من المحلول المــنظم الأساسى Buffer stock مع مراعاة إضــافة الكمية الأخــيرة من HCl ببطء مع الــتأكد من

درجة الحموضة وعند تمام ضبط درجة الحموضة يضاف ماء مقطر بحيث يصبح الحجم الإجمالى ٢/١ ٢ ضعف حجم المحلول المنظم الأساسى، يخلط المحلول المنظم المتعادل مباشرة (حتى لا يتبلور) مع حجم مماثل من محلول ٢ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم ليعطى المحلول المثبت النهائى (محلول منظم ١ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم) وتركيبه بإيجاز :

Buffer stock solution	2 vol.
0.1 N HCl to desired pH	2 vol.
Distilled water to make 5 vol.	1 vol.
2 % OsO_4 stock	5 vol.
Final mixture	10 vol.

(٢) رابع أكسيد الأوزميوم - كلوريد صوديوم OsO_4 - Na Cl

قد يضاف كلوريد الصوديوم لزيادة كفاءة مثبت باليد، حيث يساعد ذلك على الحد من انتفاخ المكونات السليولوزية فى بعض الحالات نتيجة لزيادة الضغط الأوزموزى للمحلول، ويضاف لكل ١٠٠ مل مقدار ٠,٦ جم كلوريد صوديوم .

(٣) رابع أكسيد الأوزميوم - سكروز OsO_4 - sucrose

ينصح البعض إضافة ٤,٥ جم سكروز لكل ١٠٠ مل من المثبت، ويعمل السكروز على رفع الضغط الأوزموزى للمثبت .

(٤) مثبت دالتون كروم - أوزميوم Dalton's chrome - osmium fixative

يتميز هذا المثبت بانخفاض تسرب المحتويات البروتوبلازمية ، ويتركب من :

4 % $K_2Cr_2O_7$ brought to pH 7.2 with KOH	1 vol.
3.4 % Na Cl	1 vol.
2 % OsO_4	2 vol
Final mixture	4 vol.

(٥) مثبت لوو كروم - فورمالين Low's chrome - formalin fixative

وينصح باستخدامه فى حالة الخلايا ذات الشبكة الإندوبلازمية الكثيفة ويتركب من :

CrO_2	3 %
Formalin	10 %
Na Cl	0.8 %

(٦) **البرمنجنات** Permanganate

ويتركب من :

1.2 % stock solution of $KMnO_4$	1 vol
Neutralized acetate - veronal buffer	
(كما سبق في مثبت باليد)	1 vol
Final mixture	2 vol.

(٧) **مثبت رابع أكسيد الأوزميوم بمحلول منظم من الكوليدين**

s - Collidine buffered OsO_4 fixative

يرى البعض أن للمحلول المنظم acetate - veronal buffer بعض العيوب واقترح استعمال الكوليدين (s - collidine (2, 4, 6 - trimethylpyridine بدلاً عنه، حيث إنه أكثر ثباتًا وكفاءة، ويجهز المحلول الأساسي منه كما يلي :

Pure s - collidine	2.67	ml.
Distilled water	50	ml.
N H C l	9	ml.
Distilled water to make	100	ml.

وتبلغ درجة حموضة هذا المحلول الأساسي نحو ٧,٤ ، ويمكن تعديله بزيادة أو نقص كمية حامض الأيدروكلوريك المستخدمة، ويحفظ المحلول لحين الحاجة ويجهز المثبت بإضافة حجم من المحلول المنظم الأساسي إلى حجمين من ٢ أو ٤ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم في ماء مقطر .

(٨) مثبت الأكرولين Acrolein fixative

يعطى مثبت الأكرولين (Acrylic aldehyde) نتائج طيبة فى حالة العينات النسيجية الكبيرة نسبيًا، فهو سريع التخلل جدًا، ويعمل إذا استخدم بعده مثبت يحتوى على رابع أكسيد الأوزميوم على حفظ المكونات الدقيقة بصورة جيدة . يستخدم الأكرولين بتركيز ١٠ ٪ فى محلول منظم درجة حموضته ٧,٣ إلى ٧,٥ لمدة ١٥ إلى ٤٥ دقيقة على حرارة الغرفة، ويراعى استعمال هذا المثبت بحرص بالغ لشدة سميته .

(٩) رابع أكسيد الأوزميوم مع محلول منظم فوسفاتى Phosphate buffered OsO_4

يجهز محلول منظم أساسى فوسفاتى كالتالى :

Phosphate buffer stock solution (0.15 M)

Na $H_2PO_4 . H_2O$	5.85 gm.
$Na_2 HPO_4$	15.25 gm.
Water to make	1 liter

تضبط درجة الحموضة كالمطلوب ثم يذاب ١ جم رابع أكسيد الأوزميوم لكل ١٠٠ مل من المحلول المنظم .

(١٠) جلوتار ألدهيد Glutaraldehyde

تعتبر بعض الألدهيدات محاليل حفظ ممتازة للتراكيب الدقيقة، وقد أظهر الجلوتارالدهيد نتائج طيبة فى هذا الصدد، ويحضر كالتالى :

Glutaraldhyde, 25 %	2 vol.
Phosphate buffer stock (0.15 M)	5 vol.
Water	1 vol.
Final mixture	8 vol.

يحفظ المحلول فى الثلاجة، ويدل انخفاض درجة الحموضة عن ٤ إلى عدم وانتهاء صلاحية المحلول، ينصح بمعاملة العينة بعد هذا المثبت بمحلول منظم دون جلوتارالدهيد، ثم استخدام أحد أنواع المثبت رابع أكسيد الأوزميوم، أحيانًا تكتسب العينة صلابة وتكون القطاعات ممزقة - فى هذه الحالة يخفض تركيز الجلوتارالدهيد إلى ٢ ٪ مع امتداد فترة التثبيت حتى يتم الحصول على أفضل النتائج .

إجراء عملية التثبيت Fixation procedure

توضع العينة بعد الحصول عليها مباشرة فـى قطرة من المثبت على رقائق شمع مساحتها ٧,٥ × ١٥ سم وبسمك ٢ مم، وهـى متوفرة بالمستودعات البيولوجية . تقطع العينة إلى أجـزاء صغيرة بحجم ١ مم فى حالة رابع أكسيد الأوزميوم ، وتزيد إلى عـدة ملليمترات إذا استخدم أحد الألدهيدات، يمكن التقاط هذه الأجزاء بملعقة صغيرة Spatula أو قطعة شريطية من الـورق ، وتوضـع فـى زجاجـة تحتوى على ١ مل أو أكثر من المثبت عـلى درجة صفر إلى ٤°م.

التجفيف والطمر Dehydration and Embedding

يلزم بعد تمام عملية التثبيت لأنسجة العيـنة إجراء عمليتى التجفيف والطمر (الصب فى القوالب). ويقصـد بالتجفيف تمرير الأنسجـة خلال سلـسلة من الكحولات يتـزايد تركيزها حتى الوصول إلى الكحول المطلق، ويتم الطمر بعد ذلك خلال مواد خاصة مثل ميثاكريليت Methacrylate ، وراتنـج إيُكسـى Epoxy resin والجيلاتين Gelatin - يؤخذ عـلى الميثاكـريليت الانكماش عنـدما يتبلمر كمـا يحدث أضرارًا بالتراكيـب الدقيقة، لكنه يـتميز بقدرته على تخلل أنـواع عديدة من الأنسجة كما يسهل القطع خلاله. يـنكمش راتنج إيُكسى بدرجة أقل ويحـافظ على التراكيب الـدقيقة، لكنه يتخـلل بعض الأنسجة بصـعوبة، وغالبًا مايكون القطع خلاله أصعب من الميثاكريليت، ويستخدم الجيلاتين عندما تكون معاملة العينة بالمذيبات العضوية غير مرغوب فيها .

المواد المستخدمة Materials

يفضل بعد التثبيت شطف العينة لفتـرة قصيرة للتخلص من الزائد من المثبت، فى حالة محاليل رابع أكسـيد الأوزميوم (رقم ١ ، ٢ ، ٣ ، ٧ ، ٩) والبرمـنجنات (رقم ٦) والأكرولين (رقم ٨) والجلوتارألدهيد (رقم ١٠) يستعمل محلول منظم متعادل مخفف لنصف التركيز بماء مقطر ، مـع وجـود نفس الكمـية من كلوريد الصوديـوم أو السكروز كما هو مسـتخدم مع المثبـت . وفى حالة المحاليـل الأخرى يستعمـل إما محلول يماثـل المثبت ، لكنـه خالٍ من الجوهر المثبت أو محلول كلوريد صوديوم له ذات التركيز .

سلسلة الكحولات

٥٠ - ٧٥ - ٩٥ - ١٠٠ ٪ كحول إيثايل فى الماء .

يراعى خلو الكحــول المطلق من الماء تمامًا Anhydrous ويحفظ فى زجاجـات محكمة الغلق .

ميثاكريليت Methacrylates

يمكن خلط كل من Acrylic resins n-butyl مع Methyl - methacrylate بنسب مختلفة لإنتاج قوالــب مختلفة الصلابة، وخصائص التقطيــع؛ ومن المفضل أن تكون صلابة بيئة التشرب متناسـبة مع صلابة العينة المطمورة، حيث يصاحب عدم تـناسبهما معًا صعوبة فى الحصول على قطاعات متماثلة - ويتوفر عديد مــن المواد التجاربة بأسماء مختلفة تستعمل كبيئة للطمر أو كمواد مساعدة لهذه العملية .

إيبون Epon

تتوفر راتنجات الأُبكسى Epoxy resins تجاريًا بالاسم إيبون Epon وهى ذات كفاءة مرتفعة، توضع العينة المطلوب إجراء عملية الــطمر لها على سطح مخلوط إيبون حديث معبآ داخل كبسولة چيلاتين، تستقر معظم العينــات بقاع الكبسولة قبل أن يتصلب الإيبون، ويتم نقل العينة بواسطة عصا خشبية دقيقة، أو ملعقة صغيرة .

ينصح باستخدام أنابيب زجاجية رخيصة عند غمر العينات فى مخلوط الإيبون للتخلص منها بعد إتمام هذه العمــلية، فذلك أفضل من تنظيفها، وإن لزم التنظــيف تغمر الزجاجيات عقب استعمالها مباشرة فى الأسيتون وقبل أن يــتصلب الإيبون، ثم تغسل بالوسائل المعتادة بعد ذلك .

عقب تصلب الكبسولة يرفع عنها الــغطاء (إن وجد) وتوضع فى ماء دافئ لبضعة دقائق حتى يصير الچيلاتين رخوًا ويسهل التخلص منه، وتكون القوالب معدة للاستعمال، وينصح دائمًا بإزالــة الچيلاتين قبــل حفظ القوالــب مهما طالت الــفترة منعًا لــنمو الفطريــات على الچيلاتين إذا ما توفرت رطوبة .

صبغ قوالب العينات والقطاعات الثلجية

Staining tissue blocks and frozen sections

تعمل صباغة الأنسجة بالمعادن الثقيلة على زيادة التباين بالصور الإلكترونية، ويفضل ذلك بصفة خاصة مع التراكيب ذات اللويفات مثل شعرة القطن .

يعطى Phosphotungstic acid (PTA) نتائج طيبة فى صباغة قوالب العينات، ومن الطرق البسيطة فى هذا الصدد استخدام كحول مطلق يحتوى على ١ ٪ PTA فى المراحل الأخيرة من التجفيف ولمدة ساعة، وتستكمل الخطوات كالمعتاد .

فحص الخلية بالمجهر الإلكترونى Ultrastructure of the cell

يهدف الميكروتكنيك إلى إعداد نسيج ما متضمنًا ما تحتويه خلاياه بصورة تناسب الفحص المجهرى بعد ذلك، لكن عادة ما يتطلب الأمر المزيد من المعرفة عن التركيب الدقيق لهذه الخلايا كما تشاهد بالمجهر الإلكترونى، وفى هذا المجال يبدو منطقيًا الإشارة إلى خلية نموذجية Typical cell وإن كان ذلك غير متاح عمليًا حيث يتطلب الأمر دراسة كل نمط من الخلايا على حدة - ومع ذلك فقد أمكن مشاهدة عضيات معينة فى عديد من الخلايا وهذه تعتبر من الملامح العامة لكل الخلايا بالكائنات الحية الراقية فى مملكة النبات ومملكة الحيوان أهمها ما يلى :

الغشاء الخلوى The cell membrane (CM)

وهو الحائل الرئيسى بين كل من البيئة الداخلية والخارجية للخلية، ويتولى حماية السيتوبلازم كما يتحكم فى الاتصال بالوسط الخارجى للخلية، وغالبًا ما يرى من خلال المجهر الإلكترونى على هيئة خطين كثيفين متوازيين يغلفان فراغًا إلكترونيًا شفافًا .

النواة The nucleus (N)

تنفصل النواة عن السيتوبلازم بغشاء نووى مزدوج، بداخلها النوية Nucleolus التى تحتوى على تركيز مرتفع من RNA والنوية كبيرة جدًا فى الخلايا النشطة فى تمثيل البروتين، وتحتوى نقاط الكروماتين على تركيز مرتفع من DNA .

الشبكة الإندوبلازمية The endoplasmic reticulum

قد تـكون الشبـكة الإندوبلازمـية ناعـمة أو قد يحـدها ريبوسـومات Ribosomes ، تصاحب الشبـكة الإندوبلازمية غير المحببة الخلايـا التى تمثل الجليكوجين (فى الكـبد) بينما تصاحب الشبكة الإندوبلازمية المحببة تمثيل البروتين .

اجسام جولجى Golgi apparatus (GA)

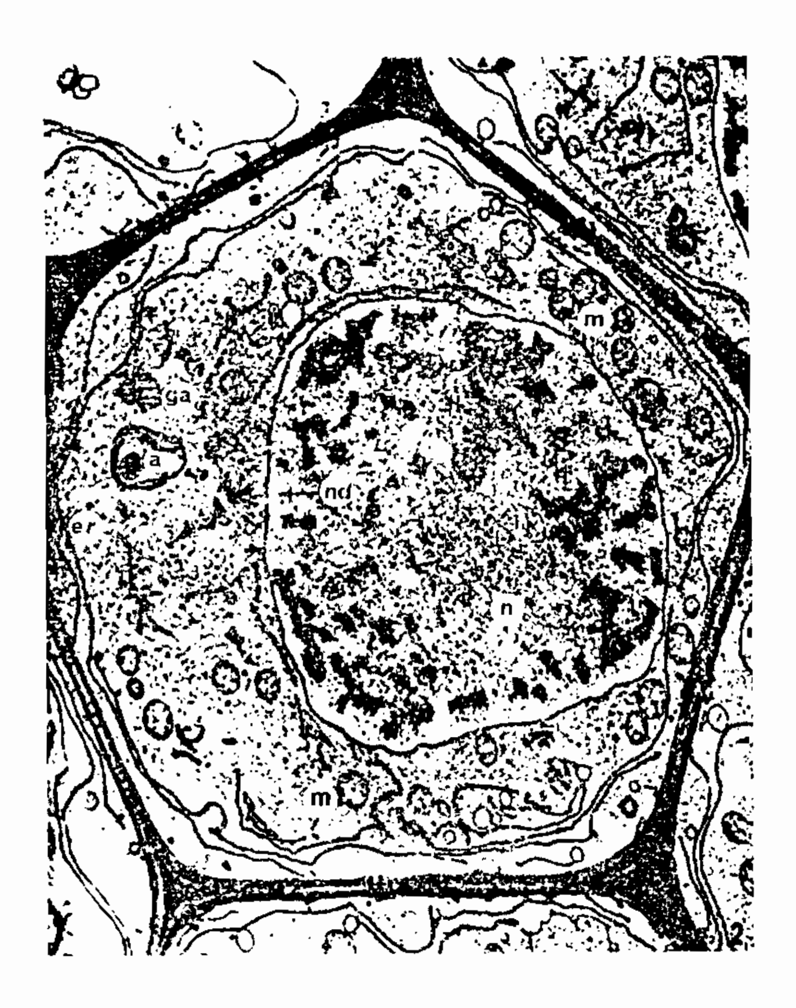
تشاهد بالخلايا التى تقوم بالإفراز .

الميتوكوندريا The mitochondria (M)

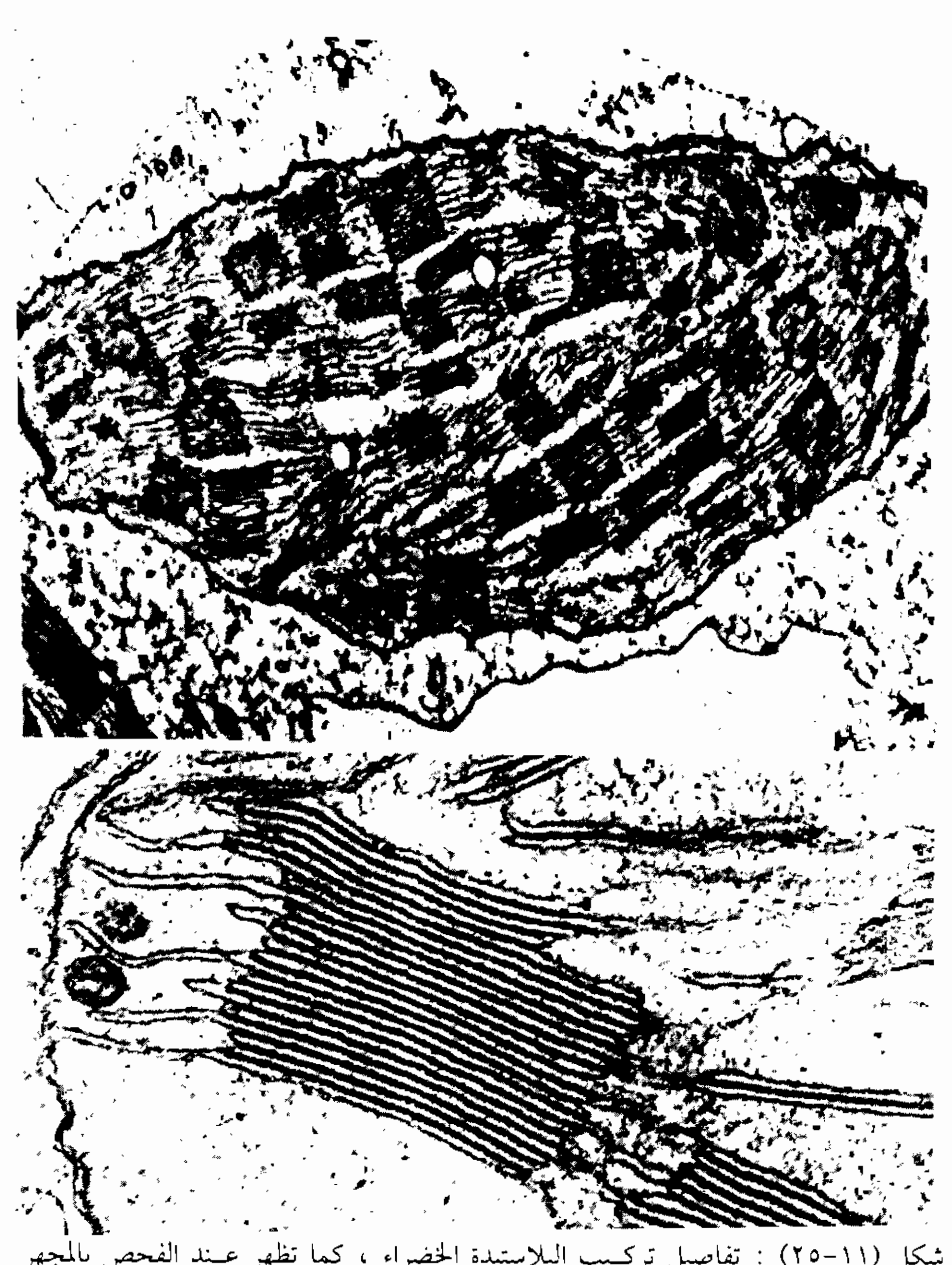
تحتوى على إنزيمات الأكسدة، وتمثل مواقع انتقال الطاقة المستخدمة ATP فى الخلية .

وبصفة عـامة يتحلى كل نوع مـن الخلايا بخصائص تـركيبية محددة تميـزه عما سواه، ويلزم للدارس الإلمام بالتركـيب الدقيق لمختلف أنواع الخلايا حتى يتسنـى له فحص التركيب الخلوى للعينات تحت الدراسة ، كما تشاهد بالمجهر الإلكترونى .

تمـثل الأشـــكال (١١-٢٤) و (١١-٢٥) و (١١-٢٦) و (١١-٢٧) أجـزاء نـباتـية مختلفة ، كما تظهر عند فحصها بالمجهر الإلكترونى .

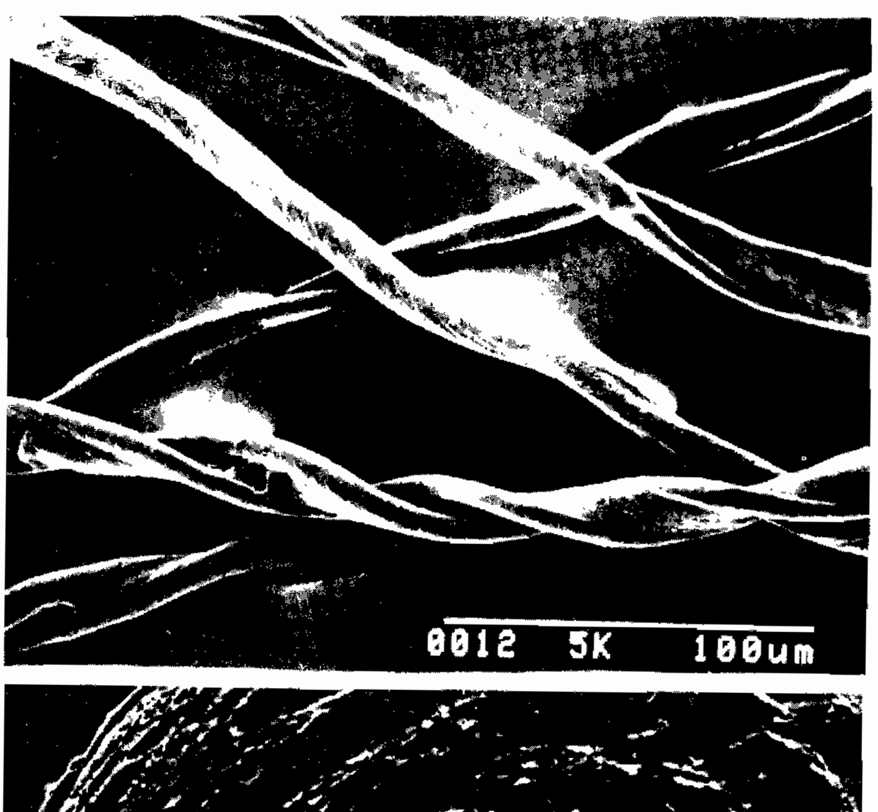


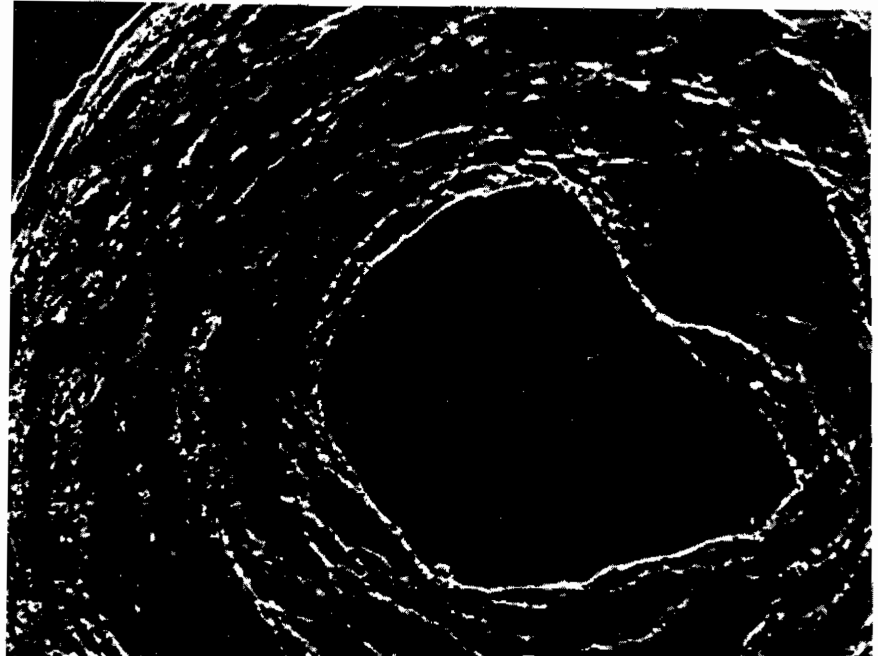
شكل (١١-٢٤) : تفاصيل تركيب خلية من قطاع عرضى فى قمة الجذر كما تبدو بالمجهر الإلكترونى المتخلل حيث: (n) النواة - (er) الشبكة الاندوبلازمية - (m) الميتوكوندريا - (ga) جسم جولجى - (a) بلاستيدة - (nd) ثقب فى غشاء النواة (X 6000) .



شكل (١١-٢٥) : تفاصيل تركيب البلاستيدة الخضراء ، كما تظهر عند الفحص بالمجهر الإلكترونى المتخلل.

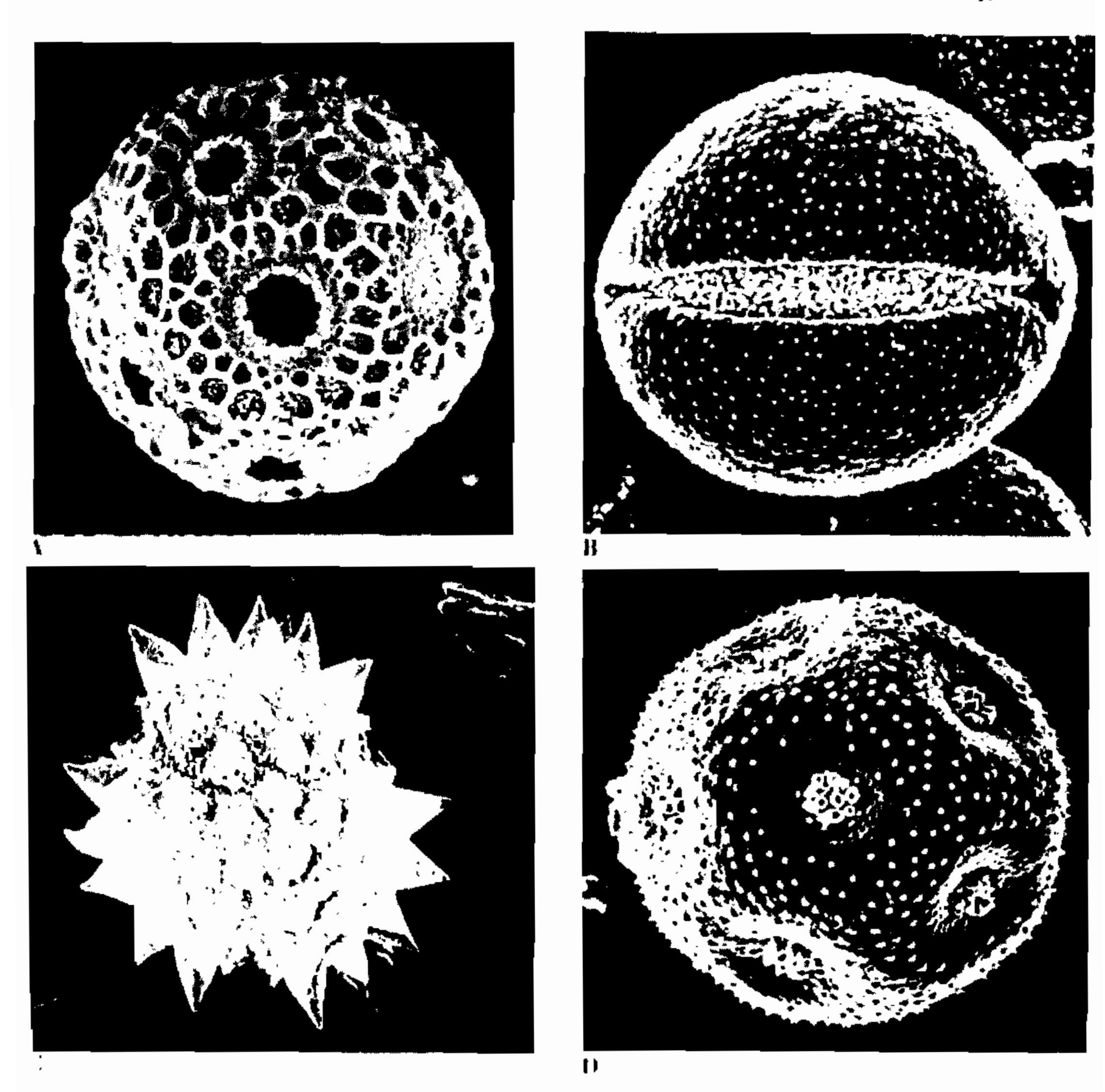
- إلى أعلى بلاستيدة كاملة تحاط بغشاء مزدوج يغلف Stroma تحتوى على Grana تتصل ببعضها بواسطة أغشية رقيقة (X 30.000) .
- إلى أسفل جزء مكبر من البلاستيدة يوضح أغشية Thylakoids مرتبة على هيئة أسطوانة قصيرة Granum وهذه تتصل بغيرها بالأغشية الرقيقة - لاحظ القطرات الزيتية كأجسام مستديرة كثيفة (X 88000) .





شكل (١١-٢٦) : تفاصيل تركيب شعرة القطن ، كما تظهر عند الفحص بالمجهر الإلكترونى .

- إلى أعلى : منظر عام بالمجهر الإلكترونى المساح (X 500).
- إلى أسفل : قطاع عرضى بالمجهر الإلكترونى المتخلل (X 3740).



شكل (١١-٢٧) : تفاصيل تركيب جدار حبوب اللقاح لإظهار بعض أشكال زركشة الجدار، كما تبدو عند الفحص بالمجهر الإلكترونى المساح.
(بولد وآخرون. Bold *et al* ١٩٨٧)

(A) *Opuntia lindheimeri* (X 1600)

(B) *Cometes surattensis* (X 2100)

(C) *Pelucha trifida* (X 2000)

(D) *Cerastium alpinum* (X 1000)

رابعاً : أنواع المجهر الحديثة

تطلق كلمة مجهر على أنواع عـديدة من المجاهر دون عدسات زجاجية ، خلاف المجهر الإلكترونـي المتخلل والمجهر الإلكـتروني المساح واتحادهمـا ، وهى تستخدم لتحـقيق أغراض محددة ، تضم هذه الأنواع ما يلى :

Thermal emission microscope

Field ion microscope

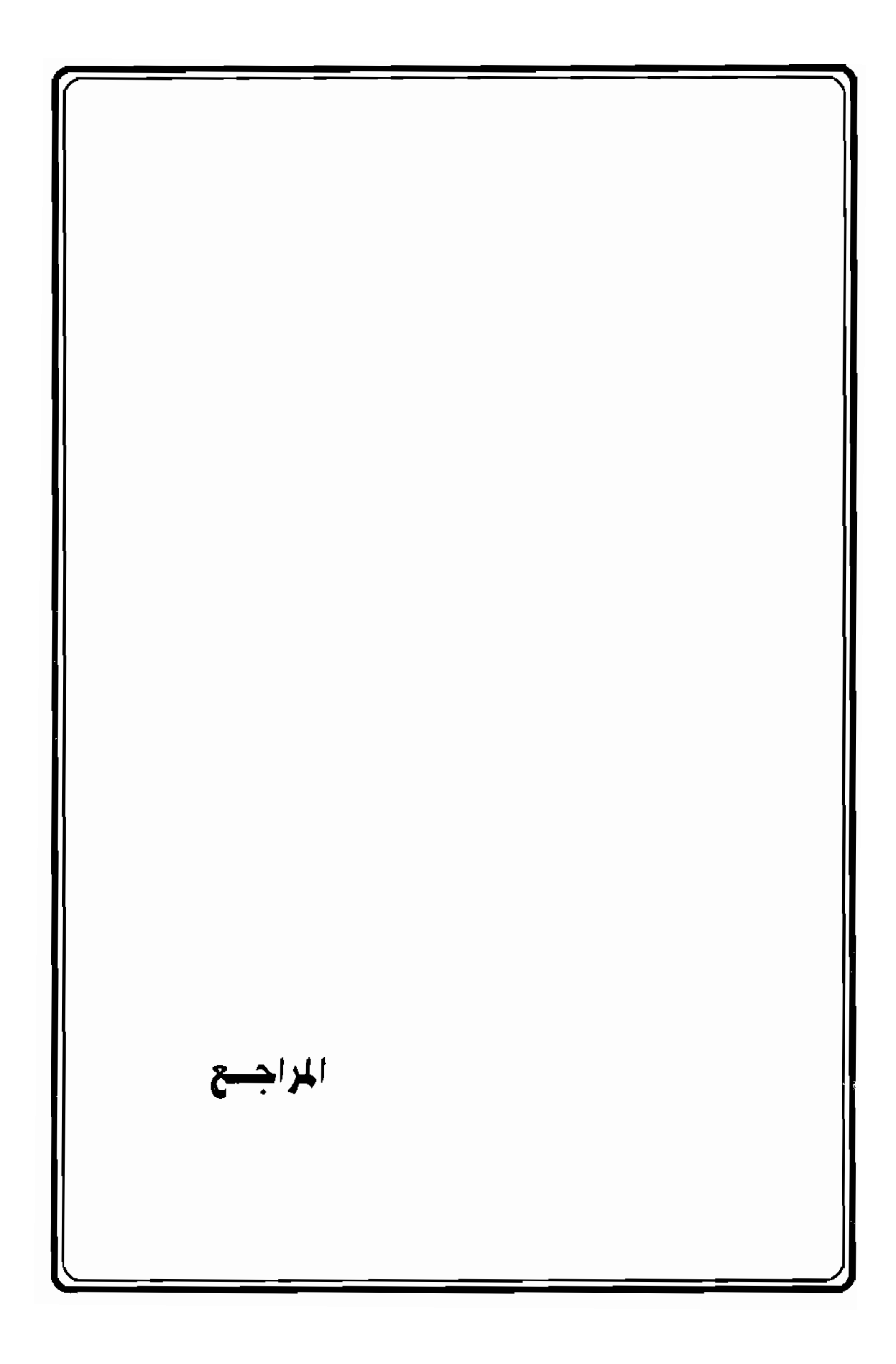
Mirror electron microscope

Scanning acoustic microscope

Scanning laser acoustic microscope

X - ray microscope

Scanning tunnelling microscope



المراجع

المراجـــــع

أولاً: المراجع العربية

محاضرات مقرر ميكروتكنيك نباتى (دراسات عليا)

عبد المجيد زاهر - قاسم فؤاد السحار - محمد عبد العزيز نصار

قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة - جامعة القاهرة .

مقدمة علم الحياة العملى (الجزء الأول)

نبيه عبد الرحمن باعشن و أحمد جمال الغزاوى (١٩٨٥)

كلية العلوم - جامعة الملك عبد العزيز - جدة .

ثانياً: المراجع الأجنبية

Barnett, H.L. and B.B. Hunter (1987).
Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th. Edit.)
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 225 pp.

Bold, H.C.; C.J. Alexopoulos and T. Delevoryas (1987).
Morphology of Plants and Fungi (5th. Edit.)
Harber & Row Publishers. 912 pp.

Gilman J.C. (1957).
A Manual of Soil Fungi (2nd. Edit.)
Iowa State University Press. 450 pp.

Hanausek, T.F. (1907).
The Microscopy of Technical Products.
John Wiley & Sons. London. 471 pp.

Hanlin, R.T. (1990).
Illustrated Genera of Ascomycetes.
American Phytopathological Society. 218 pp.

Jackson, G. (1926).
Crystal Violet and Erythrosin in Plant Anatomy.
Stain Tech., 1 : 33-34.

Richards, O.W. (1959).
The Effective Use and Proper Care of the Microtome.
American Optical Co. Buffalo, U.S.A. 92 pp.

Radford, A.E.; W.C. Dickison; J.E. Massey and C.R. Bell (1974).
Vascular Plant Systematics.
Harber & Row Publishers, 891 pp.

Sass, J.E. (1961).
Botanical Microtechnique (3rd. Edit. Reprinted)
Iowa State University Press, Ames. 228 pp.

Sorvall, I. (1965).
Thin Sectioning and Associated Technics for Electron Microscopy (2nd. Edit.)
Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Connecticut, U.S.A. 113 pp.

Stace, C.A. (1984).
Plant Taxonomy and Biosystematics.
Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 279 pp.

Willey, R.L. (1971).
Microtechniques.
A Laboratory Guide.
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 99 pp.

Wiese, M.V. (1977).
Compendium of Wheat Diseases.
American Phytopathological Society. 106 pp.

ثالثا: كتالوجات

Ames Lab–Tek (1965).
Operating Manual, Tissue–Tek
Microtome – Cryostat.
Ames Company, Inc. Westmont, Ill. 34 pp.

Carolina Catalog 64 (1994).
Biology / Science Materials.
Carolina Biological Supply Company
2700 York Road, Burlington, N (27215 – 3398).
P.O.Box 187, Gladstone, OR 97027–0187, U.S.A.

Carl Zeiss, Germany
Geschäftsbereich Mikroskopie Markering Service
Postfach 1369/1380
D. 7082 Oberkochen

Ernst Leitz GMBH,
D–6330 Wetzlar, Germany

Nikon, Japan.
Nippon Kogaku K.K.
Fuji Bldg. 2–3, Marunouchi 3–chome, Chiyoda Ku.
Tokyo 100.

Philips, Eindhoven – The Netherlands
Schotanus, B.: Electron Microscopy, What is it ?

رقم الإيداع : ١٣١٣٣ / ٩٦

عربية للطباعة والنشر
٧، ١٠ شارع السلام - أرض اللواء المهندسين
تليفون : ٣٠٣١٠٤٣ـ٣٠٣٦٠٩٨